

Entwicklung einer vereinfachten Chromo-
somen-Färbung zur G-Banden-Darstellung
und ihre Anwendung in der klinisch-zyto-
genetischen Diagnostik

Joachim-Ulrich Walther

München 1975

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München

Direktor: Prof.Dr.med. Heinz Spiess

Entwicklung einer vereinfachten Chromosomen-Färbung zur
G-Banden-Darstellung und ihre Anwendung in der klinisch-
zytogenetischen Diagnostik

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwigs-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Joachim-Ulrich Walther

aus

München

1975

Nr. 1 aus der Schriftenreihe der Fördergemeinschaft für genetische
Beratung und pränatale Diagnostik e.V.



Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr.med. J.-D. Murken

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med. H. Spiess

Dekan: Prof.Dr.med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 15.7.1975

VERGLEICHENDE LITERATURWISSENSCHAFT

4. Semester

1. Vorlesung über die Bedeutung der Dichtung für die Kultur

2.1. Vergleichende Dichtungswissenschaft

2.2. Vergleichende Dichtungswissenschaft

2.3. Die Rolle der Dichtung für die Kultur

2.4. Die Dichtung als Kunst

2.5. Die Dichtung als Kunst

2.6. Die Dichtung als Kunst

2.7. Die Dichtung als Kunst

2.8. Die Dichtung als Kunst

2.9. Die Dichtung als Kunst

MEINEN ELTERN

3.1. Die Dichtung als Kunst

3.2. Die Dichtung als Kunst

3.3. Die Dichtung als Kunst

3.4. Die Dichtung als Kunst

3.5. Die Dichtung als Kunst

3.6. Die Dichtung als Kunst

3.7. Die Dichtung als Kunst

3.8. Die Dichtung als Kunst

3.9. Die Dichtung als Kunst

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
2. Literatur über Methoden zur Chromosomenidentifizierung
 - 2.1. Konventionelle Chromosomenpräparation
 - 2.2. Konventionelle Chromosomenfärbung
 - 2.3. Erste Ansätze zur Chromosomenendifferenzierung
 - 2.3.1. Sekundärkonstruktionen
 - 2.3.2. Autoradiographie
 - 2.4. Bandentechniken
 - 2.4.1. Das alte Chromomeren-Modell
 - 2.4.2. Quinacrine-Banden
 - 2.4.3. G-Banden
 1. "Post-fixation": alkalisch
thermisch
enzymatisch
Harnstoff
Antinukleotide
 2. "Pre-fixation"
 - 2.4.4. R-Banden und T-Banden
 - 2.4.5. Abschließende Würdigung der beschriebenen Bandentechniken
3. Problemstellung
4. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse
 - 4.1. Alkali-Behandlung nach Schnedl
 - 4.2. Enzymatische Präparation nach Sperling
 - 4.3. Überlegungen zur Methode von Sperling und Versuche zum "Notwendigen und Hinreichenden" bei der Banden-Darstellung
 - 4.4. Versuche zur Rolle des Leishman-Methylenblau im Bandendarstellungsprozeß
 - 4.5. Versuch zur Bedeutung der Elektrolytkonzentration

- 4.6. Versuch zur Rolle des pH
- 4.7. Befunde zur Rolle der morphologischen Qualität der Chromosomenpräparation
- 4.8. Untersuchung zur Dauerhaftigkeit der Banden
- 4.9. Klassifizierung der erhaltenen Bandenmuster nach der Pariser Nomenklatur
- 4.10. Zusammenfassung
- 4.10.1. Methode
- 4.10.2. Ergebnisse
5. Diskussion
- 5.1. Unterschiedliche Interpretation des Wesens der Banden
- 5.1.1. De- und Renaturierungstheorie
- 5.1.2. Nukleoproteolyse
- 5.1.3. Stabilisierung der Bandenstruktur durch Kationen
- 5.2. Versuch einer Bandeninterpretation anhand der dargestellten Färbemethode
- 5.2.1. Unspezifische Präparationsschritte
- 5.2.2. Bandenspezifische Farbstoffkonzentration
- 5.2.3. Neues zur Definition von Hetero- : Eu-chromatin
- 5.3. Bestätigung der Befunde und Schlußfolgerungen anderer Autoren
- 5.4. Zusammenfassung
6. Anwendung der Methode in der Diagnostik
- 6.1. Ein Fall von Translokationsmongolismus
- 6.2. Ein Fall von Trisomie 13 (Patau-Syndrom)
- 6.3. Ein Fall von erblichem Y-Polymorphismus
- 6.4. Ein Fall von Polymorphismus auf 13p bei koinzidenteller Dysplasie einer Varianten-Trägerin
- 6.5. Ein Fall von pränatal diagnostiziertem Klinefelter-Sy.
7. Zusammenfassung
8. Literaturverzeichnis

Einleitung

Die großen Fortschritte in der Geburtshilfe, der Perinatalogie und der Pädiatrie brachten es mit sich, daß genetisch fehlerhafte Konstellationen heute viel häufiger am Lebenden beobachtet werden als noch vor einigen Jahrzehnten.

Gleichzeitig ist durch neue biochemische und mikromorphologische Ergebnisse die Diagnostik dieser Anomalien vorangetrieben worden. Sie liefert ein in zunehmendem Maße verlässliches Fundament für sinnvolle genetische Beratung.

Zwar ist nur ein kleiner Teil aller erblichen Krankheiten auf zytogenetischem Wege zu erfassen. Allerdings handelt es sich dann meist um schwerwiegende Störungen, deren Prävention wie Therapie den ärztlichen Einsatz ganz besonders herausfordern. Die in den letzten Jahren entwickelten verfeinerten zytogenetischen Techniken – in erster Linie diejenigen zur Identifizierung der Einzelchromosomen – zeigten in praxi allerdings noch zahlreiche Unsicherheiten.

Bei der Durchsicht der Literatur sowie den eigenen Versuchen zur differentiellen Chromosomenfärbung ergab sich zunächst und in erster Linie, daß die Reproduzierbarkeit der beschriebenen Techniken und mannigfaltiger Modifikationen noch sehr viel zu wünschen übrig ließ, und man den Verdacht haben mußte, dies beruhe weniger auf technischen Unzulänglichkeiten als vielmehr auf prinzipiellen Faktoren, d.h. letztlich der Unkenntnis des morphologischen bzw. chemischen Substrats der Chromosomenbanden.

Daher wurde neben der Erarbeitung einer tatsächlich zuverlässigen Methode in der Diskussion besonders deren "Substratspezifität" betont, das heißt die Tatsache, daß es sich dabei um ein dem Gegenstand der Banden adäquates Verfahren handelt.

Im letzten Kapitel wird dann an einigen ausgewählten Fällen aus der klinisch diagnostischen Arbeit im genetischen Labor demonstriert, daß die vorgestellte Technik sich wegen ihrer einfachen Durchführbarkeit und der guten Aussagekraft ihrer Resultate als Routinemethode in der diagnostischen Zytogenetik bewährt.

2. Literatur über Methoden zur Chromosomenidentifizierung

2.1. Konventionelle Chromosomenpräparation

Zu Anfang der fünfziger Jahre waren die zytogenetischen Präparationstechniken entscheidend verbessert worden (Hsu und Pomerat, 1953). Damit gelang es nach jahrelanger Ungewißheit, die Zahl der menschlichen Chromosomen endgültig und zweifelsfrei auf sechsundvierzig festzulegen (Tjio und Levan, 1956; Ford und Hamerton, 1956). *) Nun war die wesentlichste Voraussetzung zur Durchführung zytogenetischer Diagnostik von fraglich chromosomal en Erkrankungen gegeben. Standardmethoden zur routinemäßigen Herstellung von Chromosomenpräparaten wurden entwickelt (Moorhead et al., 1960; Arakaki und Sparkes, 1963). Das Prinzip sei kurz angedeutet:

Es wird eine Kultur von Lymphozyten aus peripherem Blut angelegt, die durch die mitogene Wirksamkeit eines pflanzlichen Stoffes - des Phyt hämagglutinin - zur Proliferation angeregt werden und so in drei Tagen eine beträchtliche Teilungsrate erreichen. Um den Anteil der Metaphasen in der Kultur zu erhöhen - denn nur in diesem Stadium sind die Chromosomen mikroskopisch analysierbar -, blockiert man die Zellteilungen durch Zugabe des Spindelgiftes Colchicin. Die mitotischen Prozesse laufen nur noch bis zur Metaphase ab und stauen sich - bildlich gesprochen - vor dieser Barriere an. Zur Gewährleistung genügender Ausbreitung der Chromosomen läßt man drei bis vier Stunden nach der Colchicin-Zugabe die Lymphozyten in hypotonem Milieu quellen. Anschließend wird die Zellsuspension in einem Gemisch aus Methanol und Eisessig fixiert, und nach Zentrifugation das zell- und metaphasenreiche Sediment auf Objektträger aufgebracht und gefärbt.

*) Zur Entwicklung der Chromosomenforschung vergleiche Murken und Wilmsky, 1973

2.2. Konventionelle Chromosomenfärbung

Zur herkömmlichen Färbung von Standard-Chromosomenpräparaten werden verschiedene in der Zellkern-Histologie gebräuchliche Farbstoffe verwendet, besonders Giemsa, Aceto-Orcein, Fuchsin, Karminrot und andere.

Nach dem Färbevorgang werden die Präparate mit Eukitt eingedeckt und so der Immersionsmikroskopie zugänglich gemacht. Beobachtet wird dann bei 1000- bis 1500-facher, photographiert bei 500-facher Vergrößerung. Man erhält auf diese Weise Chromosomenbilder, die hinsichtlich der Chromatid-Darstellung völlig undifferenziert und homogen gefärbt sind, die Chromosomen erscheinen als nur nach Länge und Zentromerposition unterscheidbare Chromatinkörper (vgl. Abb. 1).

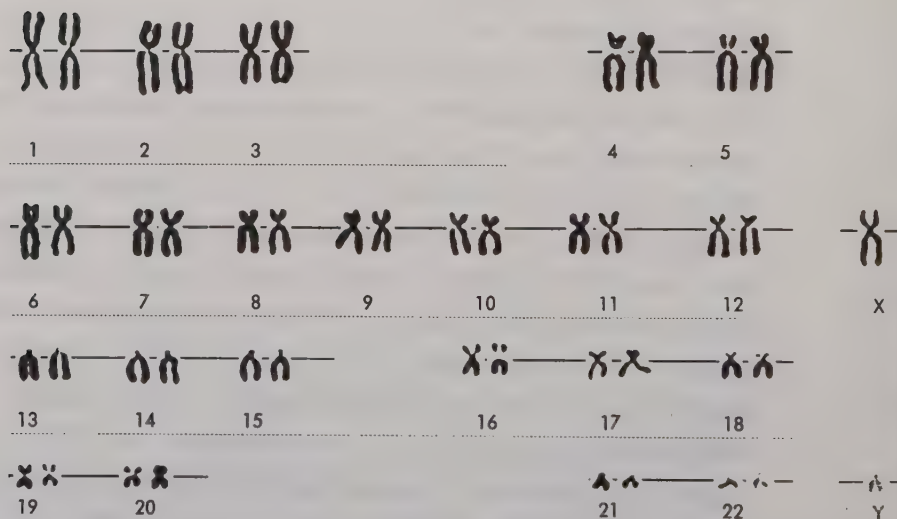


Abb. 1: Konventionelles Karyogramm nach der Denver Nomenklatur (1960)

Eindeutig zu differenzieren sind anhand dieser Kriterien nur die Chromosomen Nr. 1 bis Nr. 3 der Gruppe A und Nr. 16 bis Nr. 18 der Gruppe E. Darüber hinaus läßt sich nur die Gruppenzugehör-

rigkeit nach der Empfehlung der Chromosomenkonferenz von Denver (1960) und Chicago (1966) feststellen.

Selbst die Diagnose der Trisomie 21, der häufigsten postnatal beobachteten Chromosomenaberration, läßt sich mit so gewonnenen Karyogrammen nicht sicher stellen, da innerhalb der G-Gruppe die Chromosomen Nr. 21 nicht exakt von den Chromosomen Nr. 22 unterschieden werden können.

2.3. Erste Ansätze zur besseren Chromosomendifferenzierung

Auf der Suche nach feineren morphologischen Charakteristika der einzelnen Chromosomen war man schon damals auf die "Satelliten" an den kurzen Armen der akrozentrischen Chromosomen gestoßen, die allerdings nur in außergewöhnlichen Variationen als sogenannte Marker eine Rolle spielen.

2.3.1. Sekundärkonstruktionen

Vielversprechender freilich war die Beobachtung der sogenannten Sekundärkonstruktionen. Darunter ist eine Einschnürung und Verlängerung besonders zentromernahe gelegener Chromosomenabschnitte zu verstehen, die sich auf beide Chromatiden erstreckt und in den konventionellen Färbungen als mehr oder weniger achromatisch erscheint. Es zeigte sich, daß diese Sekundärkonstruktionen in ihrer Ausdehnung von Individuum zu Individuum variieren können, und daß diese Unterschiede nach den Mendelschen Gesetzen vererbt werden. Daher ist ihre Bedeutung für eine exakte Chromosomenidentifizierung nur relativ, während sie im Rahmen von Familienuntersuchungen durch die Kennzeichnung von Markerchromosomen zu großer Wichtigkeit gelangen können.

Das Chromosom Nr. 9 allerdings zeigt eine Sekundärkonstruktion von so charakteristischem Färbeverhalten, daß es mittels bestimmter Alkalitechniken allein an diesem Merkmal und selbst im Interphasekern identifiziert werden kann (Bobrow et al., 1972; Gagnéund Laberge, 1972).

2.3.2. Autoradiographie

Daß über diese Kriterien, nämlich relative Chromosomenlänge, Zentromerindex (das Verhältnis von langem und kurzem Chromosomenarm zueinander) und Sekundärkonstruktionen hinaus doch noch andere Unterschiede bestehen, die eine individuelle Identifizierung der Chromosomen ermöglichen, zeigte sich an den Ergebnissen der Autoradiographie (German, 1962). Dabei wird durch Zugabe von Tritium-Thymidin zur Lymphozytenkultur die Replikation der chromosomalen DNS radioaktiv markiert. Bei Markierung der späten Replikationsphasen kamen dabei unterschiedliche Markierungsmuster auf den Metaphasechromosomen zustande (Gilbert et al., 1962; Morishima et al., 1962). Am auffallendsten verhält sich das eine der beiden X-Chromosomen der Frau, das erst dann zur maximalen Replikation und damit Isotopeninkorporierung gelangt, wenn alle anderen Chromosomen ihre DNS-Synthese schon weitgehend abgeschlossen haben und dann kein H^3 -Thymidin mehr einbauen. Ferner zeigte sich, daß auch jedes einzelne Chromosom seine DNS nicht auf einmal, sondern nach einem bestimmten "Stundenplan" repliziert (besonders deutlich in den Gruppen B, D und G) (Schmid, 1963), wobei allerdings die Unterschiede zwischen den Homologen zu groß sind, um eine zweifelsfreie paarweise Identifizierung der Chromosomen zuzulassen.

Damit waren allerdings zum ersten Mal Bilder von Chromosomen entstanden, die bestimmte differentielle Eigenschaften in Form von stark bzw. schwach markierten Bezirken wiedergaben, jedoch reichte die Exaktheit noch nicht zu einer Differenzierung und Identifizierung jedes einzelnen Chromosoms auf Grund eines etwa reproduzierbar darstellbaren Replikationsmusters aus.

2. 4. Bandentechniken

2. 4. 1. Das alte Chromomeren-Modell

Seitdem Schul tz und St. Lawrence (1949) sowie Yerganian (1957) das Modell der Aufgliederung der Chromosomen in sogenannte Chromomere (zunächst an Insekten Speicheldrüsen-Riesenchromosomen entwickelt) auf den Menschen übertragen hatten, war eine Chromosomenstruktur denkbar, die – aus Portionen unterschiedlicher Chromatinzusammensetzung bestehend – dies an einer färbereichs darstellbaren Querstreifung erkennen lassen müßte. Die im Folgenden beschriebenen Bandentechniken bringen die Bestätigung dieser theoretischen Überlegung.

2. 4. 2. Quinacrine Mustard (Q) Banden:

Die Fluorochromierung bedeutete einen wesentlichen Schritt weiter auf dem Weg zur Chromosomendifferenzierung. Caspersson et al. (1970) verwendeten den fluoreszierenden Farbstoff quinacrine mustard, ein alkylierendes Derivat des Malaria-Heilmittels Chinin. Damit angefärbte menschliche Metaphasechromosomen zeigen bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht Untereinheiten von hellerer und dunklerer Fluoreszenz. Jedes Chromosomenpaar weist dabei ein charakteristisches Bandenmuster auf, das photometrisch erfaßt und so auch zur Computer-Analyse verwendet werden kann. Schon 1970 zeigte sich, daß man damit alle Chromosomen des Menschen zweifelsfrei identifizieren und paarweise zuordnen konnte, und auf diese Weise Veränderungen des Karyotyps wie Verlust von Chromosomen oder auch Chromosomenfragmenten, überzählige Chromosomen und Neuverteilungen von chromosomalem Material ("rearrangements", z.B. Translokationen) viel sicherer zu erkennen und zu beurteilen sind. Besonders auffällig ist die brillant strahlende Fluoreszenz des distalen Abschnittes am langen Arm des Y-Chromosoms, die sogar im Interphasekern deutlich zu unterscheiden ist und so die Kerngeschlechtsdiagnose "männlich" erlaubt

(Y-bodies, in Analogie zu den das Geschlechtschromatin der Frau bezeichnenden Barr-bodies) (Pearson et al., 1970). Kim et al. (1971) schlugen das dem Quinacrin verwandte Atebrin für dieselbe Färbung vor. Dieses hat ersterem gegenüber den Vorteil, billiger, leichter zu beschaffen und ungiftiger zu sein.

Nach Caspersson liegt den Fluoreszenzbanden zweierlei zu Grunde:

- 1) der Fluoreszenzfarbstoff wird spezifisch an einen DNS-Bestandteil - die Base Guanin - gebunden; dafür scheint der alkylierende Anteil der Substanz verantwortlich zu sein;
- 2) innerhalb der Doppelhelix findet zusätzlich eine sogenannte intercalierende Bindung des Fluorochroms statt, die nicht auf einen spezifischen DNS-Baustein beschränkt ist.

Daraus wurde der Schluß gezogen, daß diese Technik einerseits zu einer unspezifischen Fluoreszenzreaktion der gefärbten, doppelhelikalen DNS führe und somit Auskunft über die quantitative Verteilung der chromosalen DNS entlang den Chromatiden geben könne, daß aber andererseits die spezifische Bindung an Guanin eine qualitative Ordnung in der Zusammensetzung der Chromatiden demonstrieren bzw. illustrieren würde (Caspersson et al., 1967). Der dargestellten Aussagekraft der Fluoreszenzmethode stehen allerdings gewisse Nachteile gegenüber: einmal ist ein größerer technischer Aufwand, besonders wegen der notwendigen Anregung der Fluoreszenz durch U-V-Bestrahlung während der mikroskopischen Beobachtung, Voraussetzung. Zum Zweiten ist die Haltbarkeit der Q-Banden unter U-V-Licht sehr gering, d.h. in wenigen Minuten kann der Effekt der differentiellen Färbung schon verloren gegangen sein, und es bleibt schließlich nur noch eine gleichmäßige Fluoreszenz übrig.

4.3. Differentielle Giemsa-Färbung ("G-Banden")

Mit den Q-Banden war grundsätzlich eine Möglichkeit zur differentiellen Chromosomenanfärbung gefunden.

Unabhängig von den dazu führenden Untersuchungen erarbeiteten andere Autoren bald darauf zahlreiche hellfeldmikroskopische Techniken, die, wie sich herausstellen sollte, nicht die erwähnten Nachteile der Fluoreszenzmethode aufwiesen.

Diese Arbeiten leiteten sich her von den Versuchen zur In-Situ-Hybridisierung von Pardue und Gall (1970): sie hatten lebenden Mäuse-Zellkulturen radioaktiv markierte Satelliten-DNS (die charakteristischerweise aus hochrepetitiven Basensequenzen besteht) zugeben und deren Einbau in die Mäusechromosomen autoradiographisch kontrolliert. Dabei fanden sie, daß die Satelliten-DNS hauptsächlich zentromernahе inkorporiert worden war, und daß gerade diese Bezirke nach der zur In-Situ-Hybridisierungstechnik gehörigen Alkali-Behandlung sich mit Giemsa besonders dunkel anfärbten.

Später wurden diese Ergebnisse auf ihre Gültigkeit beim Menschen überprüft (Arrighi und Hsu, 1971). Auch hier ließ sich in den zentromernahen Bereichen sämtlicher Metaphasechromosomen mit alkalischer Vorbehandlung dieses Heterochromatin als stark gefärbt von den übrigen "euchromatischen" Bereichen abgrenzen. Man hatte also auch beim Menschen eine Beziehung zwischen dem morphologischen Phänomen des parazentrischen Heterochromatin (konstitutives Heterochromatin = C-Heterochromatin) und seiner chemischen Natur (repetitive Basensequenz, d.h. über lange Strecken der DNS-Kette kommt immer wieder nur dieselbe Base vor) hergestellt.

Von Chromosom zu Chromosom wies dieses C-Heterochromatin überdies noch unterschiedliche Ausdehnung auf, und man sah darin einen Wegweiser für die Differenzierung der Einzelchromosomen.

Die C-heterochromatischen Bezirke fallen in Nr. 1, Nr. 9 und Nr. 16 mit den Sekundärkonstriktionen zusammen, auf die unter 2.3.1. hingewiesen wurde. Die dort schon erwähnten erblichen Polymorphismen wurden auch beim C-Heterochromatin beobachtet (Craig-Holmes und Shaw, 1971).

Im Jahre 1971 wurden dann in enger zeitlicher Nachbarschaft unabhängig voneinander zahlreiche zytologische Techniken veröffentlicht, die - ausgehend von den Methoden und Befunden beim C-Heterochromatin - zu einer weitaus höheren Differenzierung führten, nämlich der charakteristischen Verteilung von eu- und heterochromatischen Segmenten über die ganze Länge jedes einzelnen Chromosoms. Erstaunlicherweise zeigten die Präparate weitgehende Übereinstimmung ihres Bandenmusters mit dem der Fluoreszenztechnik nach Caspersson.

Schon im selben Jahr gab man den neuen Methoden auf der Pariser Konferenz ("Standardization in Human Genetics", 1972) den Namen G-Banden-Techniken, da zur Darstellung dieser Bandenmuster überwiegend der Giemsa-Farbstoff verwendet worden war.

Grundsätzlich lassen sich die in der Literatur beschriebenen G-Banden-Techniken in zwei Hauptgruppen einteilen:

- 1) die Behandlung fixierter Chromosomenpräparate ("post-fixation")
- 2) die Eingriffe in die lebende Kultur ("pre-fixation").

Zu den im Folgenden beschriebenen Techniken vergleiche die Übersicht am Ende des Kapitels 2.

4.3.1. "Post-fixation"

Schnedl (1971) inkubierte die fixierten Chromosomenpräparate zunächst kurzzeitig in Alkali, anschließend über längere Zeit in neutralem Puffer. Danach wurden die Präparate mit Giemsa gefärbt. Zur Erklärung des Banden-Phänomens diente die Vorstellung, daß es im alkalischen Milieu zur Dissoziation der doppelsträngigen DNS käme, und nur diejenigen Bezirke sich im Puffer renaturieren (=reassoziieren) könnten, die eine repetitive Basensequenz besäßen. Diese stellten sich dann stärker angefärbt (heterochromatisch) dar, d.h. als dunklere "Bande" auf dem Chromosom.

Eine ähnliche Technik wurde von Drets und Shaw (1971) vorgeschlagen: sie modifizieren lediglich das alkalische pH und verwenden

statt des Puffers von Sørensen den SSC-Puffer (vgl. Legende der Tabelle 1). Patil et al. (1971) verkürzen die Behandlung, indem sie gleich im alkalischen Milieu färben, d. h. aus drei Präparationsgängen einen machen. Sumner et al. (1971) geben eine Technik an, die als einziges "pretreatment" eine Neutralinkubation bei 60 Grad Celsius vorschreibt. Hier liegt die Überlegung zu Grunde, daß die Fixierung in Methanol-Eisessig schon zur Denaturierung (Dissoziation) der DNS geführt habe, und anschließend nur noch (partiell) re-assoziiert werden müsse.

Daß nicht nur pH-, sondern auch Temperatur-Veränderungen als Mittel zur Präparation von bebandeten Metaphase-Chromosomen verwendet werden können, zeigen ferner die folgenden zwei Arbeiten: Yunis et al. (1971) beschrieben eine Bandentechnik, bei der die neutrale Inkubationslösung auf 80 bis 100 Grad Celsius erhitzt werden muß (führt allerdings nur zur Darstellung des C-Heterochromatin). Bhasin und Foerster (1972) schlugen Puffer-Inkubation bei 65 Grad Celsius vor.

Ein anderer Weg zur Bandendarstellung (nach wie vor "post-fixation") wurde von Dutrillaux et al. (1971) beschrieben, die erstmals mit proteolytischen Enzymen arbeiteten. Was in den oben erwähnten Methoden durch Alkalisierung bzw. Temperaturerhöhung bewerkstelligt wurde, sollte hier die eiweißlösende Aktivität von Pronase erreichen. Dutrillaux inkubierte seine fixierten Chromosomen in einer enzymhaltigen Elektrolytlösung und färbte sie anschließend mit Giemsa. Wieder kamen annähernd die gleichen Bandenmuster zur Darstellung wie bei den pH-orientierten Methoden.

Bald bürgerte sich neben der Pronase das Trypsin ein, von dessen bandenproduzierender Eigenschaft Seabright (1971) als einem Zufallsbefund berichtet hatte und die sie zu einer Methode verarbeitete (s. o.). Andere Untersucher beobachteten, daß in der von Seabright beschriebenen Versuchsanordnung das Enzym in einer Konzentration vorlag,

die die Integrität der gesamten Metaphaseplatten bedrohte. So modifizierten Wang und Fedoroff (1972) die Präparationstechnik dementsprechend und erhielten bessere Ergebnisse; angesichts der Überlegenheit der enzymatischen G-Banden-Techniken vermuteten sie, daß durch die proteolytische Einwirkung die DNS von ihrer Eiweißhülle befreit und somit erst in ihrer eigenen Struktur dem Farbstoff zugänglich würde.

Auch Sperling (1972) setzte die Enzymkonzentration herab (auf 0,005%) und legte die enzymatische Behandlung mit der Färbung in einem Inkubationsvorgang zusammen. Auch dabei entstanden die typischen G-Banden-Muster; wie schon Seabright hatte auch Sperling statt des herkömmlichen Giemsa- das geringfügig verschiedene Leishman-Methylenblau als Farbstoff verwendet.

Von Shiraishi und Yosida (1972) wurde eine weitere Modifikation zur Bandenfärbung angegeben: schon ein Jahr vorher hatten sie spezifische Bandenmuster an bestimmten chromosomalen Regionen beschrieben, die nach Harnstoff-Behandlung der Präparate sichtbar geworden waren (Shiraishi und Yosida, 1971). Als sie dann zusätzlich den auch von anderen Autoren vielfach verwendeten Sörensen-Puffer als Vehikel benutzten, zeigte sich das komplette G-Banden-Muster ohne die Beschränkung auf bestimmte Chromosomen-Areale.

Zur gleichen Zeit berichteten Dev et al. (1972) von einer weiteren Methode zur bandenmäßigen Differenzierung des menschlichen Chromosomensatzes: sie hatten Adenosin-Antiseren gegen einsträngige DNS hergestellt und mittels eines indirekten Immunfluoreszenz-Verfahrens die Antigen-Antikörper-Komplexe entlang der denaturierten (also aus einsträngiger DNS bestehenden) Metaphasechromosomen zur Darstellung gebracht. Dabei wurden tatsächlich wieder Bandenmuster von nahezu vollständiger G- bzw. Q-(weil Fluoreszenzmethode!)-Korrespondenz gefunden. Weiterhin zeigte sich, daß - abgesehen von geringfügigen Verschiedenheiten - die Verwendung von Antiseren gegen alle übrigen DNS-Nukleoside dieselbe Banden-Immunfluoreszenz her-

2.4.3.2. "Pre-fixation"

Einen grundsätzlichen Unterschied zu allen bisher geschilderten G-Banden-Färbeverfahren weist die Bandendarstellung nach Hsu et al. (1973) auf: hier werden vital, also noch während die Kultivierung der Zellen andauert (ca. vier bis sechs Stunden vor der "Ernte"), Substanzen zugegeben, deren spezifische DNS-Affinität bekannt ist: Aktinomycin D, Äthidi umbromid, Azur B, Cytosan und andere. Es ergeben sich, wenn die Kultur ansonsten ganz konventionell weiterverarbeitet und die Chromosomenpräparate normal mit Giemsa gefärbt werden, wieder Bandenmuster vom G- bzw. vom R-Typ (zu R-Banden vgl. nächsten Abschnitt). Die Bedeutung dieser Technik liegt neben ihrem Wert für die Herstellung von bebandeten Chromosomenpräparaten in ihrem Beitrag zur theoretischen Diskussion der Bandengrundlagen.

Hierher gehört auch die Arbeit von Shiraishi (1970), in der er von besonders deutlich beim zweiten X-Chromosom der Frau erkennbaren spezifischen Bandenmustern berichtet, die nach 12-stündiger Abkühlung der Kulturen auf Null Grad Celsius auftraten.

2.4.4. R- und T-Banden

Unter allen Neubeschreibungen von bandenproduzierenden zytogenetischen Verfahren stellte die sogenannte R-Banden-Methode von Dutrillaux und Lejeune (1971) eine Besonderheit dar, weil damit erstaunlicherweise die exakte Negativwiedergabe der G-Banden erzielt wurde. Ein wesentlicher Unterschied zu den anderen Präparationstechniken besteht nicht: es handelt sich um Hitzedenaturierung bei genau 87 Grad Celsius (post-fix.). Zakharow et al. (1972) gelang es, auch mittels einer Präfixationsmethode R-Banden darzustellen. Durch Zugabe von Bromdesoxyuridin (BrdU) werden die Chromosomen vor ihrer Fixierung so beeinflusst, daß es über unterschiedliche Spiralisierung zu einem R-Banden-Bild kommt.

Bezirke, die auf autoradiographischem Wege als spät replizierend erkannt wurden, befinden sich nach BrdU-Behandlung der Kultur in einem

weniger spiralisierten, also auch geringer kondensierten Zustand und sind damit länger als der entsprechende Anteil auf dem homologen Chromosom eines Kontrollpräparates.

Die besondere Bedeutung dieser Methode liegt in der hochdifferenzierten Anfärbung bzw. spezifischen Darstellung des zweiten X-Chromosoms der Frau, das am entspiralisierten proximalen Anteil des langen Arms zu erkennen ist.

Schließlich gelang es Miller et al. (1972) auch, mit einem Antinukleosid-Antiserum, dem Anti-Cytosin, ein R-Banden-Muster hervorzubringen. Durch Verschiebung des pH in den sauren Bereich (5, 1) gelangte Dutrillaux (1973) zu einer weiteren Modifikation: von den R-Banden blieben auf allen Chromosomen nur ganz bestimmte als heterochromatische Bezirke erhalten, die wegen ihrer endständigen Position als terminale oder "T-Banden" bezeichnet wurden. Hierbei scheint es sich also um eine noch widerstandsfähigere Fraktion des Heterochromatin zu handeln, die durch die sehr massive sowohl thermische als auch azide Behandlung von weniger stabilen, die bei der R-Banden-Färbung noch heterochromatisch erscheinen, abgegrenzt werden können. Neben ihrer theoretischen Bedeutung für die Heterochromatin-Forschung leisten die T-Banden außerordentlich gute Dienste bei der Beurteilung von chromosomalen Rearrangements, da manche Chromosomenbezirke, die mit anderen Färbeverfahren nicht eindeutig zugeordnet werden können, bei Verwendung der T-Banden-Technik selektiv markiert werden.

2. 4. 5.

Abschließende Würdigung der beschriebenen Bandentechniken

Von den genannten "Schulen" der Bandenfärbungen haben sich in erster Linie die Fluoreszenz- und die Enzym-Methode durchgesetzt. Trotzdem bleibt auf Grund der Tatsache der äquivalenten Wirksamkeit von alkalischer, thermischer, enzymatischer und immunchemischer Behandlung die Überlegung herausgefordert:

wo sind die gemeinsamen Angriffsorte – sowohl physikalisch wie biochemisch – der unterschiedlichen Färbeverfahren bzw. welches ist der all diesen Methoden gemeinsame Mechanismus, der schließlich das Phänomen der G-Banden zustandekommen läßt und auch theoretisch erklärt ?

Diese Frage ist trotz der zahlreichen Bemühungen um experimentelle und theoretische Klärung heute noch nicht widerspruchsfrei und ausreichend beantwortet *).

*) Hsu (1974) gibt eine Übersicht über die historische Entwicklung der Chromosomendifferenzierung.

Übersicht über die in 2.4.3. abgehandelten G- bzw. R-Bandentechniken

AUTOREN		VORBEHANDLUNG					FÄRBUNG				
		präfixativ	inkubiert in	postfixativ	pH	Temp.	Dauer	inkubiert in	pH	Temp	Dauer
Schnedl	1971	keine	0,07n NaOH dann Sörensen-Puffer		13,0 6,8	20 Grad 58 "	90 sec 24 h	Giemsa 10% in Weise-Puffer	7,0	20	20 min
Patil et al.	1971	"		k e i n e				Giemsa 2% in 2,8mM Na ₂ HPO ₄	9,0	20	5
Drets und Shaw	1971	"	0,07n NaOH in 0,112n NaCl dann in 12 SSC		12,0 7,0	20 65	30 sec 72 h	Giemsa 5%	6,6	20	5
Sumner et al.	1971	"	2 SSC		7,0	60	60 min	Giemsa 2% in Gurr	6,8	20	90
Bhasin und Foerster	1972	"	4 SSC		7,0	65	100min	Giemsa 5% in McIlvain	7,0	20	8
Dutrillaux et al.	1971	"	Pronase 0,005%		7,0	37	3-6min	Giemsa	keine Angaben		
Seabright	1971	"	Trypsin 0,25%		7,0	20	12 sec	Leishman 25%	6,8	20	4
Wang und Fedoroff	1972	"	Trypsin 0,25-0,5%		7,0	30	15 min	Giemsa 10%	7,0	20	2

Sperling	1972	keine	k e i n e				Leishman 25% in Sörensen mit Trypsin	6, 8	20	20
Shiraiishi und Yosida	1972	"	6M Harnstoff in Sörensen	6, 8	37	10 min	Giemsa 2% in Sörensen	6, 8	20	20
Dev et al.	1972	"	Formamid 95% in SSC	7, 0	65	30	Kaninchen-Anti- Adenosin; dann fluoresz. Anti- kanin. Globulin			
Shiraiishi	1970 24	die letzten 24 h in 0-3°C	k e i n e				Ag-hexamethylentetramin			
Hsu et al.	1973	+ Aktino- mycin D	k e i n e				Giemsa 20%			
Dutrillaux und Lejeune "R-Banden"	1971	keine		6, 5	87	10	Giemsa 4%	6, 5	20	

Sörensen-Puffer pH 6, 8; 49,2 Teile 1/15M Na_2HPO_4 : 50,8 Teile 1/15M KH_2PO_4

SSC: 0,015M $\text{Na}_3\text{-Citrat}$ in 0,15M NaCl; Weise-Puffer = stark verdünnter Sörensen-Puffer

3. Problemstellung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war, unter Zuhilfenahme der zahlreichen im zweiten Kapitel genannten Befunde und Präparationsvorschriften eine Bandenmethode zu etablieren, die durch Zuverlässigkeit, gute Aussagekraft ihrer Ergebnisse sowie Einfachheit als Routineverfahren in der klinisch-zytogenetischen Diagnostik geeignet wäre.

Wie viele andere machten auch wir dabei die Erfahrung, daß die bisher beschriebenen Techniken nicht mit genügender Zuverlässigkeit reproduziert werden konnten, und daß es bei geglückten Bandenfärbungen oft den Anschein hatte, es seien nicht die kontrollierbaren Präparations-schritte, sondern andere, zufällige Bedingungen ursächlich daran beteiligt gewesen.

Daraus ergab sich die Notwendigkeit, die offensichtlich unspezifischen, ja vielleicht sogar störenden Faktoren der untersuchten Techniken von den wesentlichen, für die Bandendarstellung notwendigen abzugrenzen und aus dem Präparationsgang zu eliminieren.

Schließlich sollte versucht werden, aus den dabei gemachten Beobachtungen und erhaltenen Resultaten spezifische Schlußfolgerungen über den Bandenmechanismus bzw. über die Natur der Chromosomenbanden zu ziehen.

4. Eigene Untersuchungen und Ergebnisse

4.1. Alkali-Behandlung nach Schnedl

Die auf der Theorie von Dissoziation und partieller Reassoziaton der chromosalen DNS beruhende Methode von Schnedl (1971) zeigte in monatelanger Erprobung keinen nennenswerten Erfolg. Bei getreuer Befolgung der Schnedlschen Präparationsvorschrift waren schließlich bestenfalls zwei Prozent der gefärbten Metaphasen bebandet. Ansonsten fiel eine durchweg zu geringe Anfärbung der Chromosomen auf. Versuchsweise individuelle Abwandlungen der Methode führten ebenfalls nicht zu brauchbaren Resultaten.

4.2. Enzymatische Präparation nach Sperling

Die Methode von Sperling (1972) dagegen zeigte von Anfang an in unserem Labor deutlich bessere Ergebnisse. Hier bestand, wie im zweiten Kapitel schon angedeutet, die chemische Beeinflussung der DNS nicht in pH-abhängiger De- bzw. Re-Naturierung, sondern auf enzymatischem Wege sollte die Bandenstruktur zur Darstellung kommen. Wir konnten Sperlings experimentelle Beobachtungen vollauf bestätigen, sowohl hinsichtlich der methodischen Einfachheit als auch der Qualität und Reproduzierbarkeit der Resultate.

Damit war also ein Verfahren gefunden, das die Voraussetzungen mit sich brachte, die für die Routinediagnostik eines klinischen Labors erfüllt sein müssen.

4.3. Überlegungen zur Methode von Sperling und Versuche zum "Notwendigen und Hinreichenden" bei der Bandendarstellung

Bei kritischer Überprüfung der Präparationsmethode und dem Versuch, den entscheidenden Faktor für das Sichtbar-Werden der Chromosomenbanden zu entdecken, erhob sich für mich die Frage nach der Bedeutung des Trypsin in dieser Versuchsanordnung. An seiner entscheidenden Mitwirkung bei dem Prozeß der Bandendarstellung ließen mich zweifeln:

- 1) die Endkonzentration von nur 0,005‰
- 2) das leicht saure pH (6,8) der Färbelösung gegenüber dem alkalischen Wirkungsoptimum von Trypsin (8,0).

Der Klärung dieses Sachverhaltes diene folgender Färbeversuch: parallel wurden Chromosomenpräparate von ca. 50 Probanden sowohl mit als auch ohne Trypsin in der Leishman-Lösung gefärbt.

Die enzymfrei gefärbten Chromosomen zeigten mit gleicher Häufigkeit und Qualität Banden wie die mit Enzym behandelten!

Bei einem groben Vergleich erwies sich ihr Bandenmuster als mit dem der enzymatischen Präparationen übereinstimmend (vgl. Abb. 2)!

4.4.

Versuche zur Rolle des Leishman-Methylenblau im Bandendarstellungsprozeß

Sperling hatte als Farbstoff Leishmans Methylenblau angegeben, im Gegensatz zu dem für diese Zwecke weitverbreiteten Giemsa-Methylenblau. Dieses enthält im Unterschied zum ersteren neben Methanol noch Glycerin als zusätzliches Lösungsmittel (Leishmans Eosin-Methylenblau für die Mikroskopie, Merck, Art.Nr. 1350; Giemsas Lösung für die Mikroskopie: Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung, Merck, Art.Nr. 9204). Ich führte Färbeserien mit Giemsa durch (unter Beibehaltung sämtlicher anderen präparativen Parameter) und benützte parallellaufende Leishman-Färbungen als Kontrollen. Dabei zeigte sich, daß die Farbstoffkonzentration bei Verwendung von Giemsa viel schwieriger auf die Erfordernisse einer differentiellen Färbung einzustellen war. Für die Herstellung von konventionellen Chromosomenfärbungen wird eine ca. 2,5%-ige Konzentration Giemsa in der Färbelösung verwendet. Doch schon eine 1,0 bis 1,5%-ige Endkonzentration reicht aus, um zu einer vollständigen Bandendarstellung zu gelangen!

Darin liegt der wesentliche Befund, daß der einzige Unterschied zwischen der bisher durchgeführten konventionellen Färbung und einer einfachen Bandenfärbung in der Verwendung verdünnter Färbelösung besteht.

Das hieße, daß in den herkömmlichen Chromosomenbildern (Denver, 1966 Chicago, 1966) die Bandenstruktur lediglich überfärbt worden war. Bei Giemsa fällt daneben auf, daß bereits kleinste Abweichungen von einer Idealkonzentration das Ergebnis der Bandenfärbung stark beeinträchtigen können (vgl. Abb. 3).

Auch die Leishman-Banden sind in ihrer Qualität natürlich stark von der Farbstoffkonzentration in der Pufferlösung abhängig, doch ist der Bereich, in dem eine brauchbare Bandenfärbung gewährleistet ist, bedeutend breiter, wie aus der Abbildung 3 hervorgeht. Es handelt sich bei dieser differentiellen Chromosomenfärbung offensichtlich nicht um eine "Alles-oder-Nichts-Reaktion", wie die Proportionalität zwischen Farbstoffkonzentration und Bandendifferenzierung beweist. Es können auch Korrekturen an einem ersten Färbeergebnis vorgenommen werden: bei Unterfärbung ist durch eventuelles Nachfärben noch eine Steigerung der Differenzierung zu erreichen, überfärbte Präparate können durch Behandlung mit 50%-igem Alkohol entfärbt und anschließend sorgfältig neu gefärbt werden.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß zur Herstellung von brauchbaren Bandenpräparaten weder Leishman- noch Giemsa-Methylenblau als Farbstoff unumgänglich sind, sondern daß vielmehr die Endkonzentration in der Farblösung wohl die entscheidende Rolle spielt (vgl. Abb. 3)!

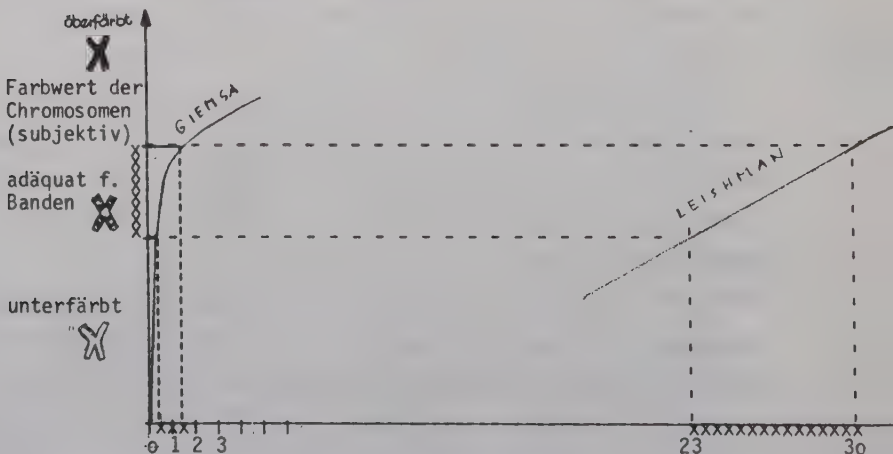


Abb. 3: Unterschiedliche Abhängigkeit der Bandenqualität von der Farbstoffkonzentration bei Giemsa- und Leishman-Methylenblau

Farbstoffkonzentr., (%) in der Pufferlösung

4. 5. Versuch zur Bedeutung der Elektrolytkonzentration

Ein zusätzlicher Befund geht aus der Abbildung 4 hervor: der Vergleich zwischen Leishman- und Giemsa-gefärbten Chromosomen zeigt, daß erstere konstant einen größeren Durchmesser bei gleichem Spiralisationsgrad besitzen als die mit Giemsa gefärbten. Da alle anderen präparativen Parameter der beiden Serien identisch waren, muß dieser Unterschied auf die Farbstoffe bzw. die mit ihnen sich verändernden Ionenkonzentrationen zurückzuführen sein: denn in der Leishman-Färb-Endlösung herrscht eine um 25 Prozent niedrigere Kationenkonzentration als in der Giemsa-Endlösung (hervorgerufen wird diese Differenz durch die unterschiedliche Verdünnung des Sörensen-Puffers mit Leishman- und Giemsa-Stammlösungen). Die "Giemsa-Chromosomen" werden also in einem der Leishman-Lösung gegenüber osmotisch hypertonen Milieu gefärbt, was offensichtlich zur "Entquellung" führt. In einer neuen Färbeserie verringerte ich die Elektrolytkonzentration des Sörensen-Puffers um den Faktor zehn und beobachtete, daß die in dieser hypotonen Lösung gefärbten Chromosomen diffuser, schlechter gefärbt und kontrastiert erschienen und vor allen Dingen keine Bandenmuster aufwiesen.

4. 6. Versuch zur Rolle des pH

Ein in allen beschriebenen Bandentechniken bedeutsamer Parameter der Präparation ist das pH der jeweiligen Inkubationslösung. In der hier dargestellten Abwandlung der Sperlingschen Methode liegt das pH nach wie vor bei 6,8, determiniert durch den Sörensen-Puffer im Mischungsverhältnis: 49,2 Teile Na_2HPO_4 : 50,8 Teile KH_2PO_4 .

War in 4. 5. dieses Verhältnis konstant gehalten, die absolute Elektrolytkonzentration des Puffers aber variiert worden, so veränderte ich jetzt die Stöchiometrie des Sörensen-Puffers unter Beibehaltung seiner Elektrolytkonzentration von 1/15 Mol/Liter und erfaßte so seinen pH-Bereich von 3,0 bis 8,0. Das Ergebnis ist in der Abbildung 5 wieder-



Abbildung 4: Vergleich zweier Karyogramme desselben Probanden aus
enzymfreien Präparation, gefärbt mit Giemsa obere Zelle

Leishman untere Zelle

NB den unterschiedlichen Quellungsgrad der Chromosomen (s. Text)

gegeben (für jedes eingestellte pH wurden hundert Mitosen geprüft).

Anteil aus-
wertbarer
Bandenmeta-
phasen!

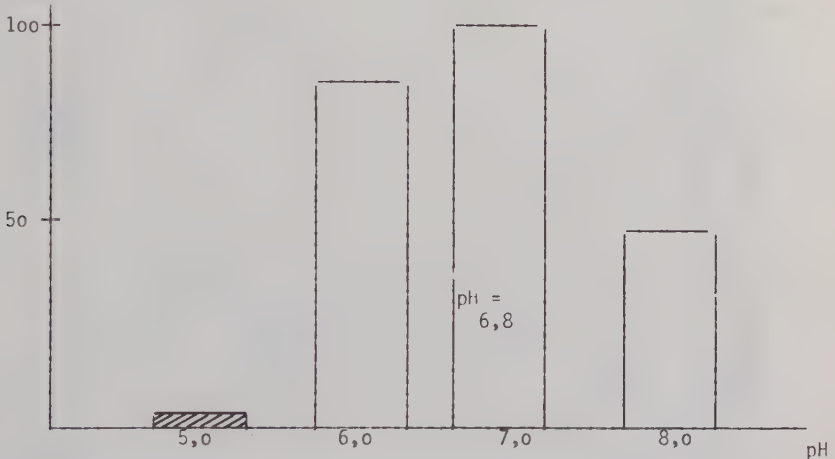


Abb. 5: Beziehung zwischen C-G-Bandenfärbung und pH der Färbelösung

Es zeigte sich, daß bei einem pH von 6,8 die Banden-"Ausbeute" optimal ist. Je saurer bzw. alkalischer die Färbelösung reagiert, umso weniger nimmt das Chromatin die Farbe an, und umso weniger sind Banden erkennbar.

4.7. Befunde zur Bedeutung der morphologischen Qualität der Chromosomenpräparation

Ein bei der Präparation auch von allen anderen Autoren immer wieder festgestellter wichtiger Faktor zur Herstellung auswertbarer Bandenpräparate ist die morphologische Qualität der Metaphaseplatten.

- 1) Es muß gute Ausbreitung der Chromosomen gewährleistet sein; in den Versuchen zur vorliegenden Arbeit bewährte sich die Technik des Auftropfens gegenüber der des einfachen Benetzens des Objektträgers.

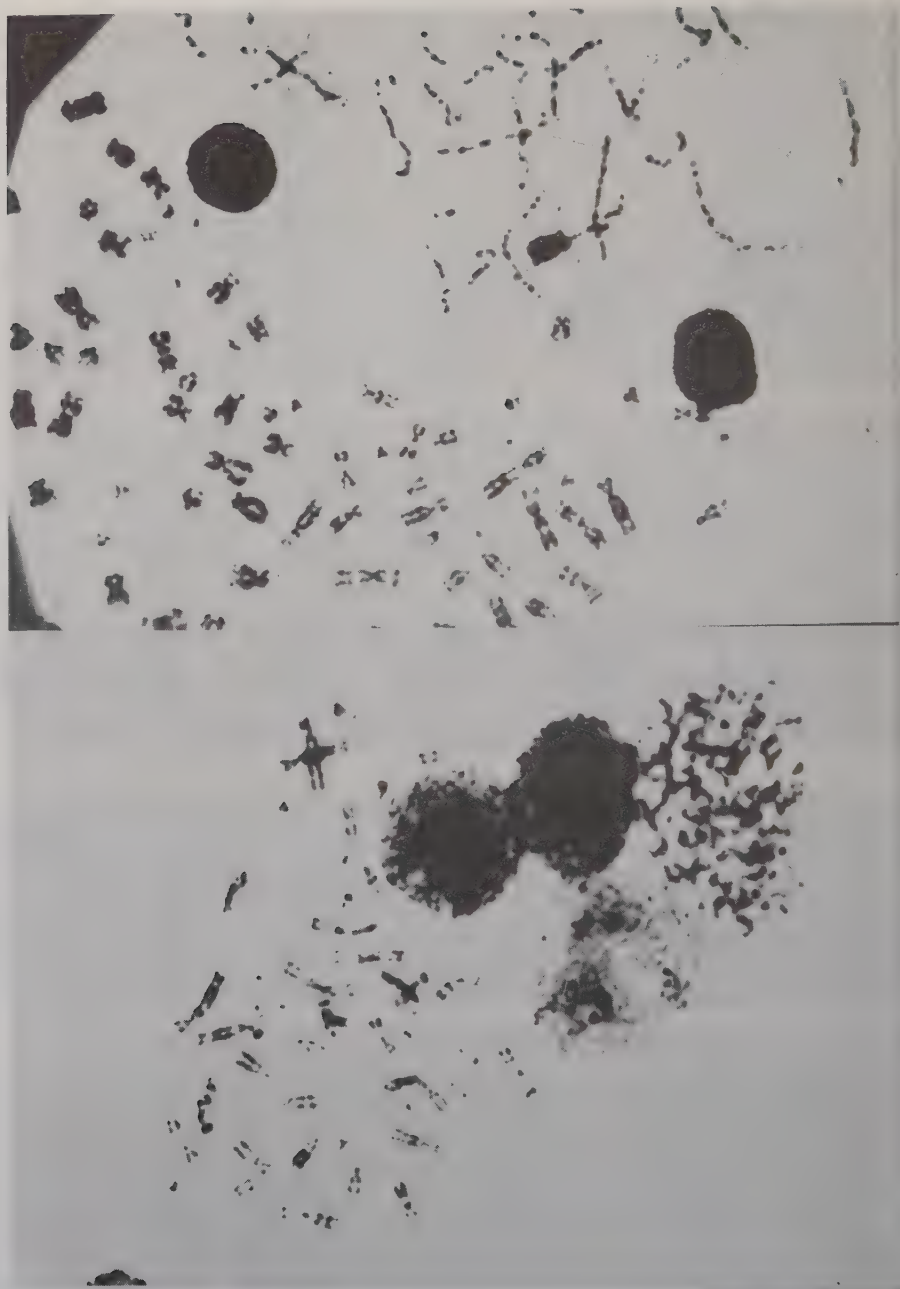


Abb. 6a und 6b: zufällig nebeneinanderliegende mitotische Zellen in verschiedenen Teilungsphasen: unten rechts Prophase, oben rechts frühe Metaphase, oben links späte Metaphase, sonst Interphase und Metaphase

- 2) Zusätzlich hängt es vom Spiralisationsgrad bzw. Kondensationszustand der Chromosomen ab, ob man die einzelnen Chromosomenanteile scharf genug auseinanderhalten kann. Idealerweise sollte die Colchicineinwirkung am Ende der Kultur so lange andauern, bis eine maximale Anzahl von Mitosen sich in der relativ frühen Metaphase befinden, wo die Kontraktion und Spiralisation zwar schon zur eindeutigen Formgebung der Chromosomen geführt hat, aber noch nicht so weit fortgeschritten ist, daß die auf den Chromatiden gelegenen eu- und heterochromatischen Bereiche sich färberisch nicht mehr voneinander trennen lassen. Auf der Abbildung 6a und b sind Mitosen in verschiedenen Stadien nebeneinander zu sehen und demonstrieren die für die Bandenanalyse vorteilhafteste frühe Metaphase.

Es zeigte sich weiterhin für die hier vorgestellte Methode, daß es sich empfiehlt, erst unmittelbar vor dem Färben die Suspension mit den fixierten Chromosomen aufzutropfen. Das fixierte Material im Reagenzglas behält dagegen die Bandenfärbbarkeit über längere Zeit.

4.8. Untersuchung zur Dauerhaftigkeit der Banden

Um festzustellen, ob die mit der dargestellten Methode präparierten Bandenchromosomen unmittelbar nach dem Färben und Eindecken ausgewertet werden müssen oder auch gelagert und nachuntersucht werden können, untersuchte ich die Haltbarkeit des Bandenmusters: innerhalb von zwei Jahren ließ sich keine Veränderung der Zahl noch der Qualität der Banden-Metaphasen feststellen (vgl. Tab. 2).

4.9. Klassifizierung der erhaltenen Bandenmuster nach der Pariser Nomenklatur

Die in Paris erarbeiteten Schemata (Paris Conference, 1971) wurden mit den nach der hier vorgestellten Methode angefärbten Bandenmustern verglichen. Auf den folgenden Abbildungen sind jeweils fünf Original-

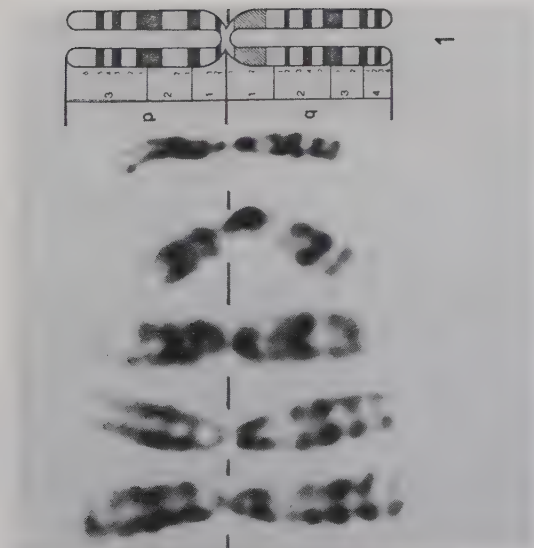
exemplare jedes einzelnen menschlichen Chromosoms aus verschiedenen Präparaten dem der Pariser Nomenklatur entstammenden Schema gegenübergestellt. Über die Einzelheiten geben die Bildunterschriften Auskunft, hier sei nur Folgendes gesagt:

die Gegenüberstellung der auf den ersten Blick als echte G-Banden imponierenden Bilder mit den auf der Pariser Konferenz definierten Mustern zeigt rasch, daß die im Schema "variabel" (schraffiert) bezeichneten Bezirke mit der vorliegenden Technik allesamt schwarz, d. h. heterochromatisch erscheinen. Es handelt sich hier offensichtlich um das C-Heterochromatin, das besonders auffällig an den Chromosomen Nr. 1, Nr. 9, Nr. 16 und Y in Erscheinung tritt. Das Zentromer-C-Heterochromatin der Chromosomen Nr. 7, Nr. 17, Nr. 18 und Nr. 10 erscheint auf den Diagrammen überhaupt nicht, ist aber auf den Präparaten meist zu sehen.

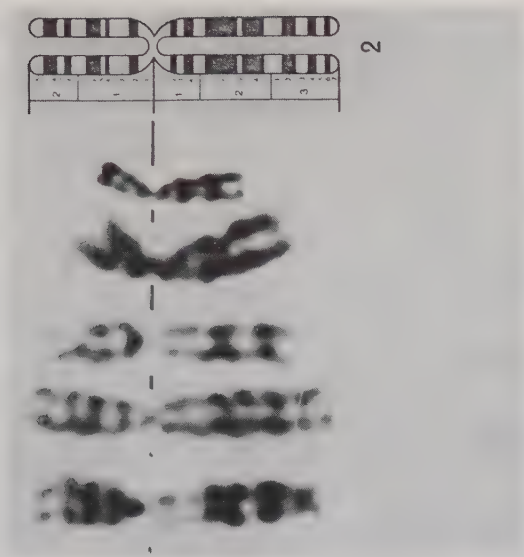
Aus diesem Grunde könnte die vorliegende differentielle Chromosomenfärbung als C-G-Banden-Technik angesprochen werden. Auch C-Banden Polymorphismen sind auf den Abbildungen zu erkennen, besonders deutlich am Y-Chromosom.

Alter der Präparate in Monaten	0,25	0,75	1	2	3	12	18	24
Anteil der auswertbaren Metaphasen in Prozent	97	80	100	97	97	100	80	85

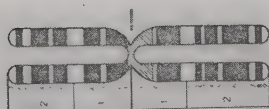
Tabelle Nr. 2: Häufigkeit ausreichend bandengefärbter Metaphasen in Abhängigkeit vom Alter der Chromosomenpräparate



Völlige Übereinstimmung mit dem Schema aus der Pariser Nomenklatur; der schraffierte Bezirk tritt hier als C-Heterochromatin in Erscheinung

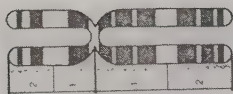


Alle Banden des Schemas können wiedergefunden werden; teils mit besserer, teils mit schlechterer Auflösung



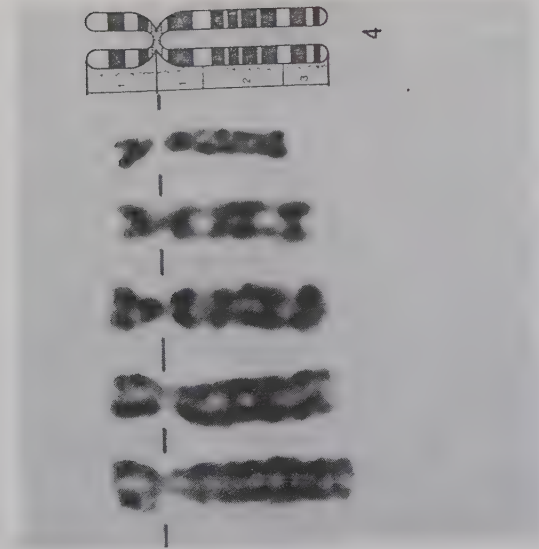
3

Auf dem langen Arm ist wieder das C-Heterochromatin dargestellt, ansonsten alles entsprechend dem Schema, mit deutlicher Abstufung der Farbtintensität zwischen den einzelnen Heterochromatinbereichen, denen gegenüber das Euchromatin auf der Photographie fast ungefärbt erscheint

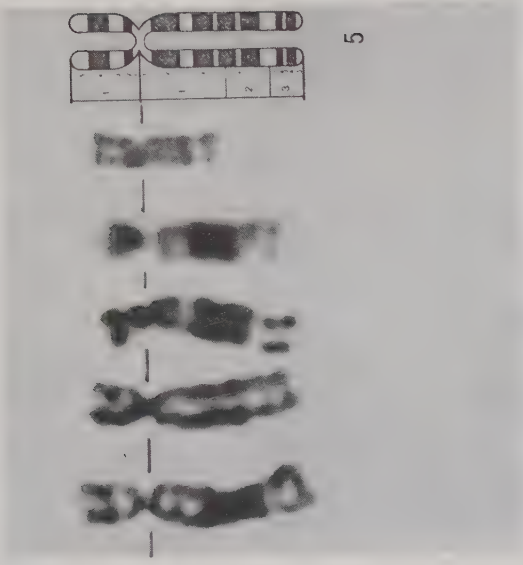


6

Gekennzeichnet durch die immer stark ausgeprägte euchromatische Bande auf dem kurzen Arm stimmt auch dieses Chromosom sehr gut mit dem Muster überein

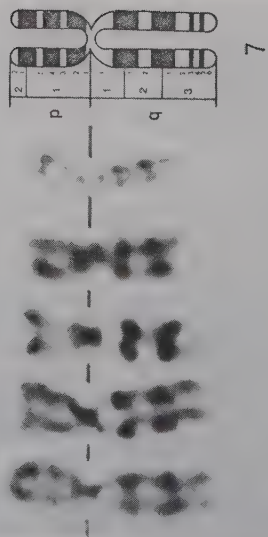


4

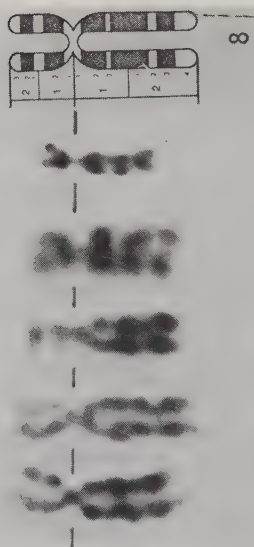


5

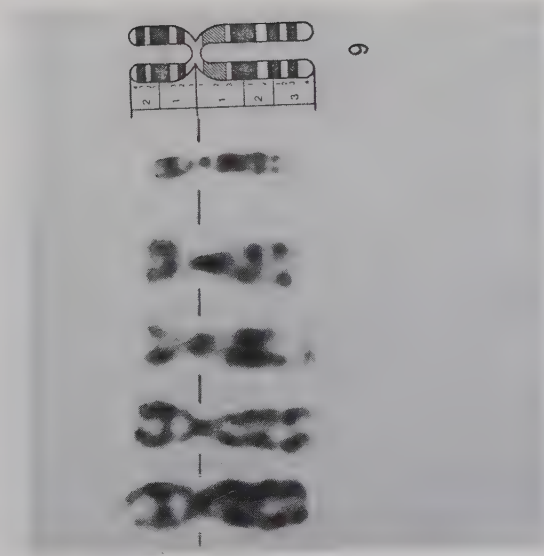
Hier war es äußerst schwierig, den schon nahezu identischen Mustern des Schemas die präparierten B-Chromosomen zuzuordnen. Laut Schema unterscheiden sich Nr. 4 und Nr. 5 im Zentromer (bei Nr. 4 variabel heterochromatisch) sowie auf dem langen Arm (bei Nr. 4 heterochromatische "Unterbanden" gegenüber drei bei Nr. 5). Die nach der hier erörterten Methode präparierten B-Chromosomen zeigen immer beide eine sehr stark gegenüber dem Rest des langen Armes kontrastierende breite, zusammengesetzte heterochromatische Bande, die eher aus drei als aus vier Untereinheiten zusammengesetzt erscheint-



Im Gegensatz zum Schema zeigt sich hier eine deutliche C-Bande am Zentromer, ansonsten gute Übereinstimmung, auch untereinander; NB gleichartige Abstufung der Farb-
tiefe einzelner Banden

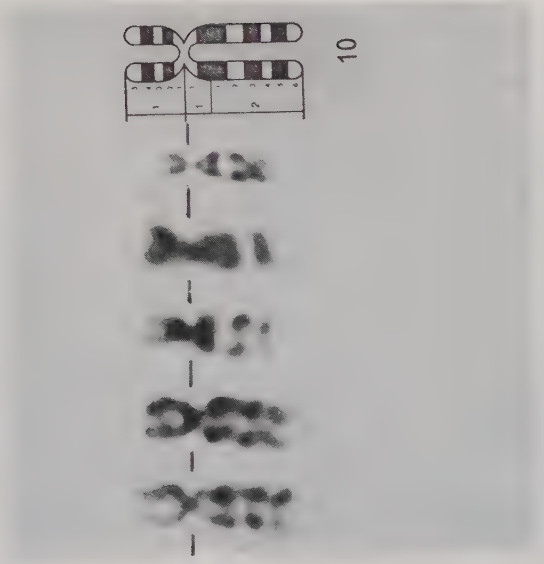


Abgesehen von der C-Inkongruenz völlige Übereinstimmung mit dem Muster



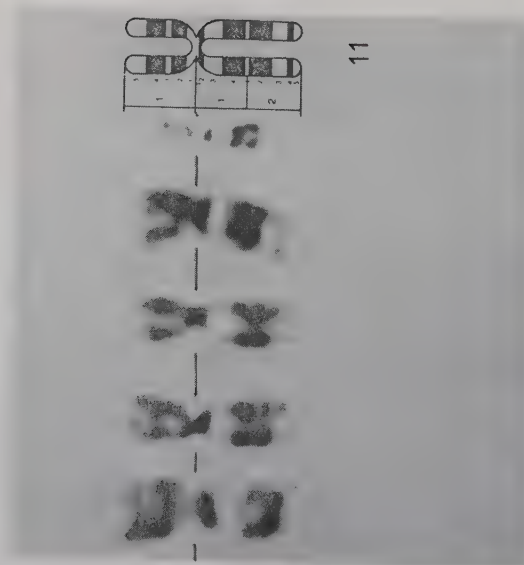
9

Wie bei Nr. 8

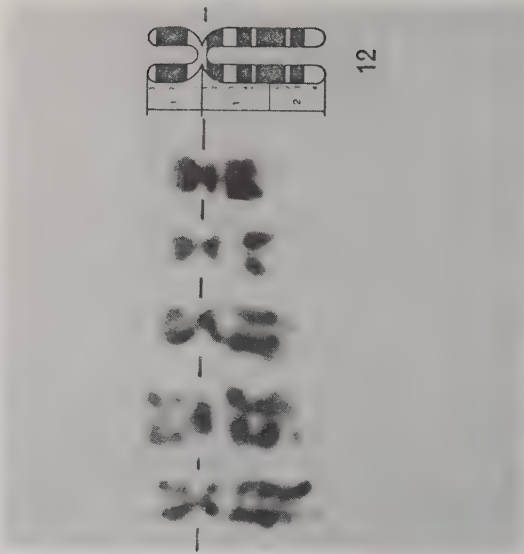


10

Wie bei Nr. 8, 9

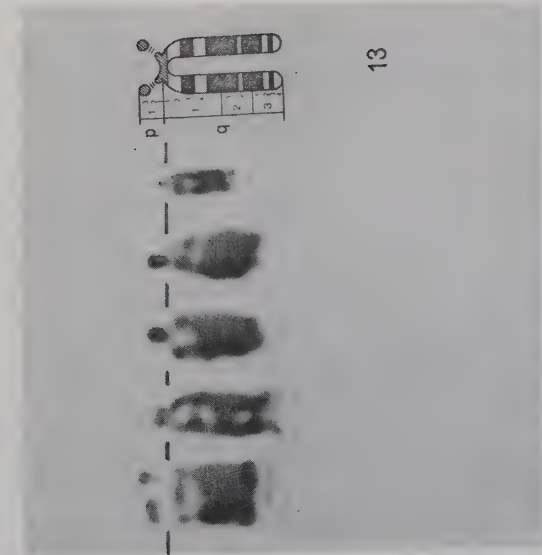


11

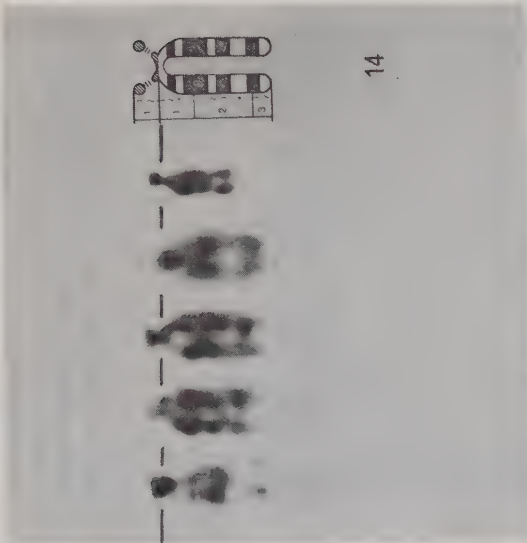


12

Bei Nr. 11 und Nr. 12 erscheint die euchromatische proximale Bande auf dem langen Arm fast schon als "gap" im Sinne der konventionellen Färbung; gute Übereinstimmung mit dem Modell. Nebenbei kommt die Variabilität durch unterschiedliche Spiralisation (vgl. Text 4.7.) deutlich zur Geltung

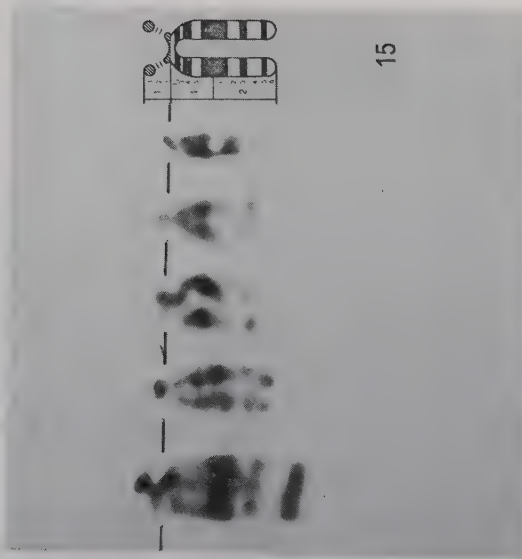


13



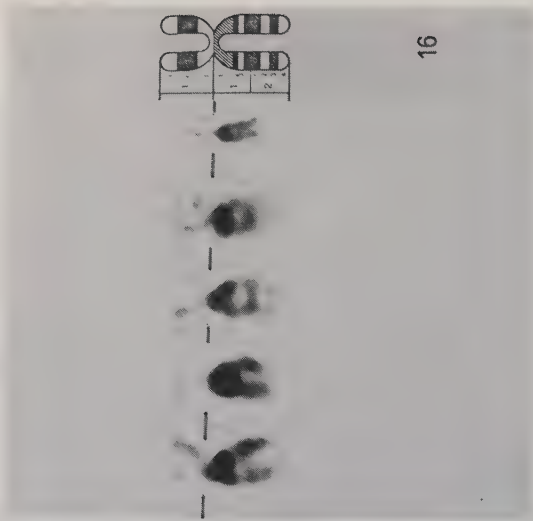
14

Bei Nr. 13 und Nr. 15 liegt jeweils ganz links eine sog. Endoreduplikationsform vor; dieses Phänomen verdeutlicht die Bandenstruktur im Sinne eines Multiplikationseffekts (entsprechend den Drosophila-Speicheldrüsen-Riesenchromosomen). Obwohl das heterochromatische Konglomerat auf dem distalen Abschnitt des langen Arms von Nr. 13 oft nicht mehr bis in seine Untereinheiten aufzulösen ist, ergibt sich klare Übereinstimmung mit dem Muster; abgesehen von den Satelliten, die im Übrigen bei der hier vorgestellten Färbung so gut wie nie beobachtet werden und offensichtlich aus reinem Euchromatin zusammengesetzt sind. NB auch hier das Zentromer! Nr. 14 und Nr. 15 einfach voneinander zu unterscheiden durch dunkler gefärbtes Nr. 14!



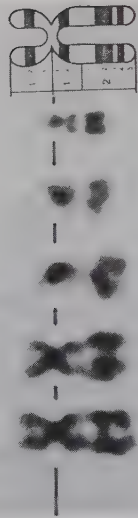
15

Siehe die Bildunterschrift von Nr. 13/14



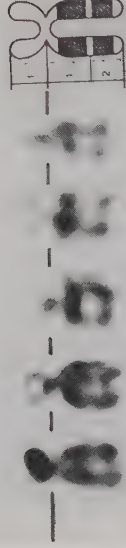
16

Nr. 16 ist einer der "Prototypen" des zentromernahen C-Heterochromatins, das hier das restliche G-Heterochromatin ganz in den Hintergrund drängt



17

Ähnliche Verhältnisse wie bei Nr. 16, allerdings geringer ausgeprägt

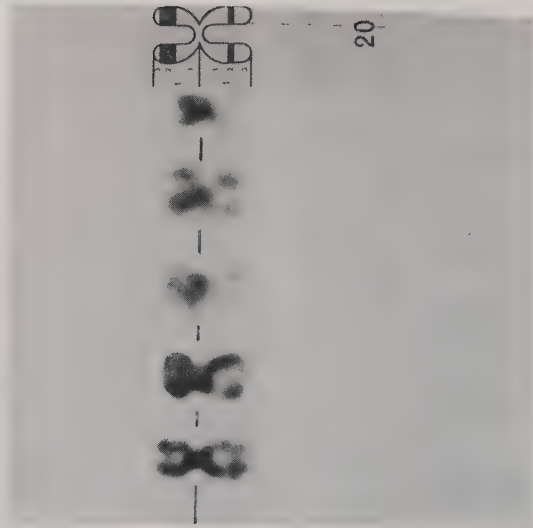


18

Die Anföhrung des kurzen Armes links ist antefiziell, sonst gute Übereinstimmung

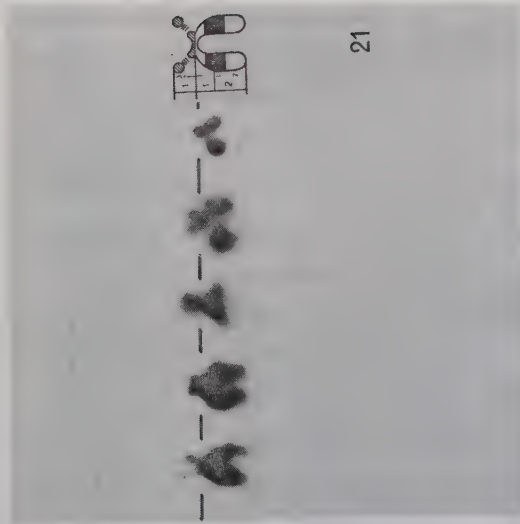


19

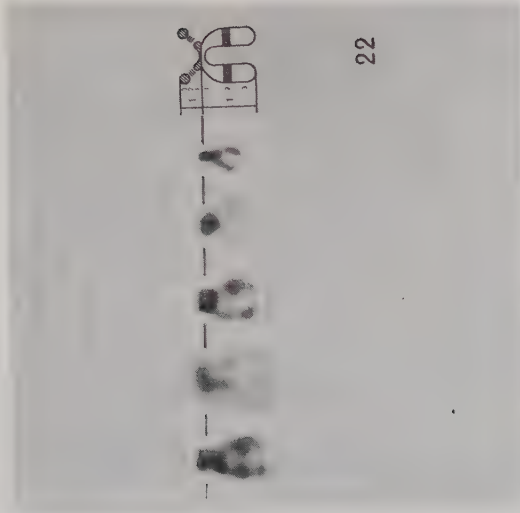


20

Bei beiden F-Chromosomen klare Übereinstimmung der Bandenmuster mit dem Modell

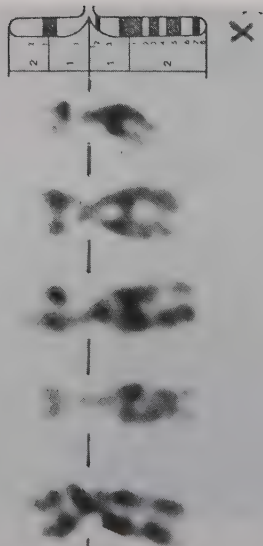


21

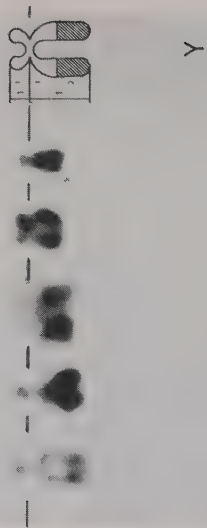


22

Die G-Chromosomen sind sehr gut charakterisiert, was bedeutsam für die Diagnose des Down-Syndroms sein kann. NB wieder C-Heterochromatin beim 22-Zentromer!



Die isolierte Bande Heterochromatin auf dem kurzen Arm charakterisiert das X-Chromosom innerhalb der C-Gruppe



Hier färbt sich das distale Ende des langen Arms (vgl. Y-body und C-Heterochromatin) oft noch stärker an als bei Nr. 1 und Nr. 16 die zentromernahen Partien, sodaß gelegentlich schon im Interphasekern die Y-Diagnose mittels der G-C-Färbung möglich scheint.

4.10. Zusammenfassung

4.10.1. Methode

Die Chromosomenpräparation erfolgt nach der Mikromethode von Arakaki und Sparkes (1963). 0,1 ml heparinisierten Kapillar- oder Venenblutes werden 68 Stunden in fünf Milli liter Kulturmedium (Earle's B. S. S. 1%; W/O Phenol Red; Batch N^o U 942506; Cat. N^o 401 S) von GIBCO bei 37 Grad Celsius inkubiert. Drei Stunden vor Kulturabbruch Zugabe von 0,001 Milligramm Colcemide (CIBA) zur Kultur. Fünfzehn Minuten vor Abbruch wird zentrifugiert (fünf min bei 800 U/min), der Überstand verworfen, das Sediment mit hypotoner (0,075M) KCl-Lösung versetzt (ad 5 ml).

Kulturabbruch: Zentrifugieren s.o.; Fixativ: drei Teile Methanol auf ein Teil Eisessig ad 3 ml zugeben, nochmals zentrifugieren s.o.

Sediment auf ca. 0,5 bis 1,0 ml mit Fixativ auffüllen - ergibt die auf-tropffertige Zell suspension. Diese kann nun im Kühlschranks (4 Grad) gelagert oder für sofortige (!) Färbung auf entfettete, eisgekühlte Objektträger aufgetropft (3 - 5 gtt.), an der Luft oder auf mäßig warmer Heizplatte (30 - 40 Grad) getrocknet und 20 Minuten in der Farblösung inkubiert werden; je nach Qualität der Farbstoff-Chargen kann Nachfärben von einigen Minuten Dauer bzw. Ent- und Neu-Färben notwendig werden (vgl. 4.4.). Anschließend zweimaliges, vorsichtiges Spülen in Leitungswasser oder aqua dest. Schließlich Eindecken mit Eukitt.

Farblösung: 1 Teil Leishman Eosin-Methylenblau-Lösung aus

Trockensubstanz Merck Art. 1350	0,12 g
Methanol bei 40 Grad Celsius	<u>ad 100,0 ml</u>
4 Teile Sörensen-Puffer pH = 6,8	
aus KH_2PO_4 1/15 M	50,8 ml
Na_2HPO_4 1/15 M	<u>ad 100,0 ml</u>

bzw. 1 Teil Giemsa's Lösung Merck Art. 9204

99 Teile Sörensen-Puffer s.o.

Es empfiehlt sich, die Objektträger in hohen Färbeküvetten zu inkubieren, da erfahrungsgemäß immer eine gewisse Sedimentation der Farb-"Lösung" eintritt, die innerhalb der 20-minütigen Färbung ein minimales Konzentrationsgefälle entlang des hochkant stehenden Objektträgers aufbaut. Dieses ermöglicht dann eine differenziertere "Auswahl" von ideal gefärbten Metaphasen innerhalb eines bestimmten mittleren Bereiches des Objektträgers (vgl. Abb. 7).

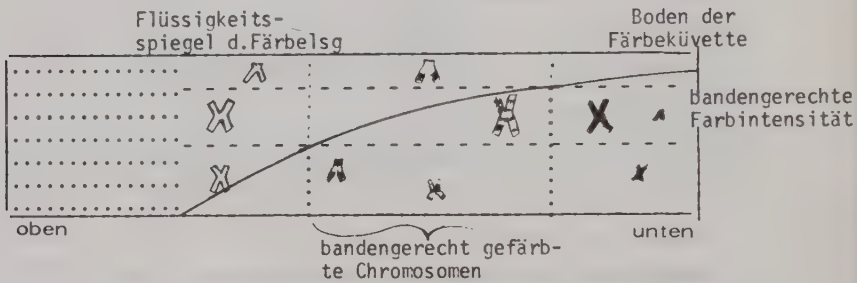


Abbildung 7 : Sedimentationsbedingter Gradient der Farbintensität über der Längsachse des Objektträgers

Mikroskopische Beobachtung der Chromosomen mit Leitz Orthoplan bei 1000-facher Vergrößerung. Zwecks besseren Kontrastes empfiehlt sich die Verwendung zahlreicher Grünfilter Panchrom. und besonders des Filters BG36+S546 (Leitz).

Photographiert bei 500-facher Vergrößerung mit dem Film Agfa Ortho 25 möglichst lange Belichtungszeit (scheinbar überbelichteter Film ergibt auf den Abzügen die besten Resultate in der differentiellen Auflösung der verschiedenen Grautöne), Schwarz-Weiß-Abzüge auf Agfa BN 1.

4. 10. 2. Ergebnisse

Bei Verwendung einer enzymfreien Modifikation der Sperlingschen Färbemethode lassen sich - in Abhängigkeit von Kultur- und Präparationsqualität der Metaphasen - sowohl mit Giemsa- als auch mit Leishman-Methylenblau bei neutralem pH und Zimmertemperatur gut analysierbare Ban-

denmuster mit hoher Reproduzierbarkeit darstellen. Sowohl Veränderungen des pH als auch der Puffer-Osmolarität beeinträchtigen diesen Prozeß.

Der entscheidende Schritt vom konventionellen Giemsa-gefärbten Chromosomenbild zum "C-G-Banden-Muster" scheint die Verdünnung des Farbstoffes, d.h. die Vermeidung von Überfärbungen zu sein.
(Walther et al., 1974)

5.

Diskussion

Unter den im Vorigen referierten Befunden war der wesentlichste derjenige, der zeigte, daß die Darstellung des regelmäßigen C-G-Bandenmusters auf menschlichen Metaphasechromosomen möglich ist, ohne daß bisher für entscheidend gehaltene präparative histochemische Schritte unternommen werden; das Phänomen der Banden stellte sich sowohl mit als auch ohne Verwendung der Proteinase Trypsin in unterschiedlosen Qualität und Quantität ein.

In dieser Arbeit wurde eine Technik beschrieben, auf deren Basis theoretische Überlegungen geradliniger zu einer Aussage über die Beschaffenheit der dargestellten C-G-Banden führen sollten, als dies bisher der Fall war. Der inerte Charakter der vorgestellten Methode müßte von vornherein eine große Zahl möglicher Irrtümer bzw. Mißdeutungen von nebensächlichen Faktoren ausschließen können.

Aus diesem Grunde wird im Anschluß an eine Übersicht über die bisherigen Banden-Diskussion eine Aufschlüsselung der C-G-Methode nach ihren wenigen Reaktionsschritten versucht.

5.1.

Unterschiedliche Interpretationen des Wesens der Chromosomenbanden in der Literatur

Wie im zweiten Kapitel berichtet, waren es zunächst gar keine enzymatischen Techniken, mit denen G-Banden dargestellt wurden. Entsprechend den verschiedenen präparativen Methoden gliedern sich auch die Theorien über Wesen und Mechanismus der Chromosomenbanden auf. Heute bestehen im Wesentlichen drei verschiedene Ansatzpunkte zu ihrem Verständnis:

- 1) die Theorie von De- und Re-Naturierung
- 2) die Theorie der Nukleoproteolyse
- 3) die Theorie der kationenabhängigen Stabilisierung der Chromatinkonformation.

1.1. De- und Re-Naturierungstheorie

Deren Vertreter hielten entweder die Inkubation im stark sauren Fixativ (Sumner) oder die Alkali-Behandlung (Drets/Shaw, Schnedl, Patil) für den entscheidenden Schritt zur Strukturveränderung des Chromatin. Interpretiert wurde diese Strukturveränderung als Denaturierung, d. h. als Auflösung der Doppelhelix in einsträngige DNS, die sich durch geringere Affinität zum Farbstoff vom doppelsträngigen Heterochromatin unterscheidet. Was aber führt dann zum Phänomen der Banden, d. h. dazu, daß schließlich selektiv nur wohldefinierte Bezirke des Chromosoms ihre native Struktur aufgegeben haben, die übrigen dagegen weiterhin in der doppelhelikalen Konformation der DNS vorliegen und sich heterochromatisch verhalten?

Schnedl gab dafür die folgende Erklärung: die in der eineinhalb-minütigen Alkali-Inkubation vollständig dissoziierte chromosomale DNS kann in der anschließenden neutralen Pufferung bei 58 Grad C an den Stellen wieder doppelsträngig werden, wo dies auf Grund ihrer Primärstruktur besonders einfach zu bewerkstelligen ist. Dies ist der Fall an den Orten repetitiver Basensequenz, wo über längere Strecken des Kettenmoleküls hinweg die beiden Stränge auch bei geringer Verschiebung gegeneinander immer noch komplementär und damit reassoziierbar sind.

Sumner dagegen argumentiert, daß schon mit der Fixierung eine vollständige Denaturierung verbunden sei und es daher nur noch auf die partielle Renaturierung bei neutralem pH ankäme, die - wieder entsprechend dem Grad der Basenrepetitivität und in Abhängigkeit von Temperatur und Dauer

der Inkubation - in bestimmten Chromatid-Bereichen abliefe, in anderen, weniger bzw. gar nicht repetitiven Regionen aber nicht.

Das von Dutrillaux und Lejeune (1971) geprägte Schlagwort von der "dénaturation ménagée", also der kontrollierten Denaturierung, entspricht dieser Vorstellung ebenso wie die "sequential denaturation" nach de la Chapelle et al. (1973), die darüber hinaus besagt, daß in Abhängigkeit von ihrem AT/GC-Quotienten DNS unterschiedlich rasch denaturiert werden kann.

5.1.2. Nukleoproteolyse

Andere Autoren geben an, mittels der proteolytischen Wirkung von Enzymen die Banden besser und sachgemäßer darstellen zu können: nach der Vorstellung von Wang und Fedoroff (1972) wird das durch die Fixierung denaturierte Chromatin-Eiweiß durch Proteasen vollständig entfernt, und auf diese Weise der DNS-Strang direkt der Färbe-Prozedur zugänglich gemacht, nach Meisner et al. (1973) aber werden nur bestimmte Proteinfractionen entfernt und geben so der differentiellen Färbung der Nukleoproteinkomplexe Raum.

Dieser Interpretation liegt die biochemische Tatsache zu Grunde, daß Eiweiß in zwei grundsätzlich verschiedenen Formen als Chromatinbaustein vorkommt: erstens als basische, "acid soluble" Histone, zweitens als saure "Nicht-Histone". Meisner et al. schreiben also dem Proteinelement des Nukleoproteinkomplexes wesentliche Bedeutung als dem eigentlichen Träger der Bandenstruktur zu, während nach Wang und Fedoroff erst nach der Entfernung aller Proteine die bandenmäßig strukturierte DNS "demaskiert" zum Vorschein kommt.

5.1.3. Stabilisierung der Bandenstruktur durch Kationen

Beide Thesen werden durch Sehested herausgefordert, der 1973 auch mit inaktiviertem Trypsin, das seine proteolytische Eigenschaft verloren hatte, G-Banden darstellte. Er interpretierte die Rolle des Trypsin als eine physikalische und schrieb ihm hauptsächlich oberflächenstabilisierende Wirkung zu. Auch Warburton (1972) hatte experimentelle Befunde

gegen die proteolytische Entstehung der Banden vorgebracht und ein definiertes Kationenmilieu der Enzymlösung als wesentliche Voraussetzung der differentiellen Chromosomenfärbung postuliert.

Bei vergleichenden Untersuchungen zum Banden-Entstehungsmechanismus folgten Kato und Moriwaki (1972) aus ihren Befunden, daß entsprechend spezifischer Löslichkeit respektive Herauslösung von chromosalem Protein die Banden entweder dargestellt oder aber ihr Hervortreten verdeutlicht würde. Diese Beeinflussung der Proteinlöslichkeit geschähe sehr leicht durch sorgfältige Einstellung einer niedrigen Kationenkonzentration in der Inkubationslösung, hauptsächlich von Natrium-Ionen. Lundsteen et al. (1974) kommen aus ihren experimentellen Beobachtungen zu der gegenteiligen Schlußfolgerung, daß nämlich nur das proteolytisch aktive Trypsin den für die Bandenentstehung essentiellen Mechanismus induziere. Ihr Befund ist allerdings mit größter Wahrscheinlichkeit auf die zusätzlichen - von anderen Methoden differierenden - Parameter in der diesbezüglichen Versuchsanordnung zurückzuführen und kann - wie auch von ihnen eingeräumt - keine generelle Gültigkeit haben.

Die fluoreszierenden Q-Banden sind ebenfalls ohne spezifische Vorbehandlung darzustellen und beruhen nach Caspersson auf Bindung von unterschiedlichen Mengen des DNS-spezifischen Fluorochroms, zusätzlich zur Guaninspezifischen Bindung, die möglicherweise für die Unterschiede zwischen Q- und G-Banden-Muster verantwortlich ist.

5.2. Versuch einer Bandeninterpretation anhand der dargestellten Färbemethode

5.2.1. Unspezifische Präparationsschritte

Wie auch bei allen anderen herkömmlichen Methoden zur Herstellung nicht behandelter Chromosomenpräparate findet eine Inkubation in hypotonem Milieu sowie die anschließende saure Fixierung statt.

Die Bedeutung dieser allen Präparationsmethoden gemeinsamen Einflüsse auf das Chromatin hinsichtlich der Bandenfärbung ist bei der vorliegenden

Fragestellung nach Specifica der differentiellen Färbung nicht relevant. Ich beschränke mich auf die "post-fixation" Schritte der Präparation und suche in meiner Methode den entscheidenden, für das Zustandekommen der Banden notwendigen und hinreichenden Faktor zu finden. Dabei zeigt sich für die in Kapitel 4 genannten quantifizierbaren Variablen der Färbeserien, nämlich pH, Osmolarität, Farbstoff und Farbkonzentration jeweils ein Optimum, bei dem das Bandenfärbeergebnis am sichersten gewährleistet ist. Gegeneinander austauschbar sind – unter Berücksichtigung ihrer unterschiedlichen Chromatin-Affinität (vgl. 4.4.) – die Farbstoffe Giemsa- und Leishman-Methylenblau. Auch die Parameter Osmolarität und Wasserstoffionenkonzentration zeigten – wie aus Text und Abbildung in Kapitel 4 hervorgeht – keinen eindeutigen "Alles-oder-Nichts"-Zusammenhang mit der Chromatindifferenzierung, denn sie alle lassen gewisse Abweichungen um das Optimum nach oben und unten zu.

5.2.2. Bandenspezifische Farbstoffkonzentration

Anders verhält es sich bei der Einstellung der Farbstoffkonzentration: wie schon gesagt wurde, ist hier sorgfältigste Einstellung immer der entscheidende Faktor zum Gelingen des Färbeprogrammes. Die benötigte Konzentration liegt um die Hälfte unter der für konventionelle Chromosomenfärbung üblichen. Die Schlußfolgerung (in Kap. 4 schon ausgesprochen) liegt also nahe, daß der wesentlichste Faktor differentieller Chromatinfärbung darin besteht, eine egalisierende Überfärbung zu vermeiden. Statt im Überschuss wird demnach der Farbstoff so dosiert, daß offenbar eine der jeweiligen Chromatinmenge proportionale Anfärbung zustande kommt.

Die Kinetik der Bandenfärbung kann durch einen Vergleich mit der Chromatographie charakterisiert werden:

Hier wie dort werden Substanzen auf Grund bestimmter, teilweise sehr geringfügiger qualitativer und quantitativer Verschiedenheit differenziert. Der chromatographischen Wanderstrecke entspricht bei den Banden die unterschiedliche Farbintensität, dem chroma-

tographischen Startpunkt der ungefärbte Zustand der Chromosomen, In der Zeiteinheit binden die am dichtesten gelagerten Chromatin-Konglomerate mehr Farbstoff pro Längeneinheit der Chromatid-Achse als die weniger kondensierten Anteile.

Die extreme Steigerung des Auflösungsvermögens durch Verlängerung der Wanderstrecke bei der Chromatographie könnte theoretisch durch eine extreme Verdünnung des Farbstoffes auch bei der Bandenfärbung erreicht werden.

5.2.3. Neues zur Definition von Hetero-: Eu-Chromatin

Viel Chromatin = stark gefärbt = Heterochromatin

wenig " = schwach " = Euchromatin

In diesem Sinne einer der Menge der Nukleoproteinkomplexe proportionalen Anfärbung ergäbe sich für die Klassifizierung des Chromatin folgende Perspektive:

abhängig von der jeweiligen Chromatindichte und der verwendeten Farbstoffkonzentration stellt sich ein bestimmter Chromatid-Ort als hetero- oder als euchromatisch dar.

Im idealen Fall ließe sich dann definieren:

Die Grenze zwischen Eu- und Heterochromatin liegt bei n Nukleotiden pro Längeneinheit der Chromatide.

Die C-Banden bzw. das C-Heterochromatin läge dann dementsprechend mit deutlichem Abstand an der Spitze dieses Spektrums der Chromatinkondensation auf menschlichen Metaphasechromosomen.

Selbstverständlich böte diese Klassifizierung nur eine etwas präzisere Beschreibung eines morphologischen Phänomens und sagte nichts aus über eventuelle Ursachen einer so geordneten Mengenverteilung. Zugrundeliegende Mechanismen bzw. weitere Strukturqualitäten wie z.B. basensequenzspezifische Unterschiede zwischen einzelnen Chromatid-Regionen hätten in diesem Modell durchaus Platz und Bedeutung.

5.3. Bestätigung der Befunde und Schlußfolgerungen anderer Autoren

Einen Hinweis auf mögliche Bedingungen zur Erhaltung dieser konstant unterschiedlichen Chromatin-Dichten gibt das Ergebnis des Versuchs 4, 5. : bei konstantem Mischungsverhältnis der basischen und der sauren Anteile des Puffersystems, d. h. bei konstant gehaltenem pH, nahm die Bandenfrequenz mit sinkender Molarität der Lösung ab. Liegt in der Molarität der Inkubationsmedien möglicherweise eine Voraussetzung für die Erhaltung der Chromatinkomplexe, d. h. für die spezifische Anordnung stark und schwach kondensierter Regionen?

In phasenkontrastmikroskopischen Bildern (ungefärbter Präparate!) fanden sich Strukturen an menschlichen Chromosomen, die unschwer als G-Banden identifiziert werden konnten (McKay, 1973). Aus verglichenen Untersuchungen der Inkubationslösungen schloß McKay daraufhin auf die wesentliche Bedeutung eines bestimmten Kationen-Milieus für die Erhaltung der Bandenmuster beim Färbevorgang. Damit stimmt er mit Warburton überein, betont aber darüber hinaus den ursprünglichen Charakter der G-Banden, d. h. die Tatsache, daß diese Struktureigentümlichkeit keinerlei Artefakt der Präparation, sondern morphologisches Kennzeichen des intakten Chromosoms sei.

Dies ist auch die wesentliche Aussage der Arbeit von Yunis und Sanchez (1973), in der nach sorgfältigen Vergleichsuntersuchungen gefunden wurde, daß die zur Herstellung von konventionellen Chromosomenpräparaten verwendete Farbkonzentration für Bandenpräparate zu hoch liege und lediglich verdünnt werden müßte. Auch sie verzichteten auf jedes "interpretament"; ihre Befunde werden von meinen Beobachtungen in jeder Hinsicht bestätigt. Als letzter Hinweis auf unterschiedliche Chromatin-Dichte ist das wahre Substrat der Chromosomenbanden sei die Untersuchung von Röhm (1974) genannt, der nach einer experimentellen sogenannten "vorzeitigen Chromosomenkondensation" Färbungen durchführte und Muster von sich heller und dunkler anfärbenden Partien beobachtete, die er dann wahrscheinlich den G-Banden entsprechend analysieren konnte.

All diese Befunde sprechen gemeinsam dafür, daß die Chromosomenbanden Ausdruck der originalen, regelmäßigen Verteilung unterschiedlicher Chromatinmengen über die Chromatiden sind.

Daß so lange keine einheitliche Theorie über die Natur der Chromosomenbanden entworfen werden konnte, liegt wohl hauptsächlich an der Vielfalt der teilweise widersprüchlichen Methoden und auch an der weithin ungenügenden Reproduzierbarkeit.

5. 4. Zusammenfassung

Folgende drei Punkte scheinen für die Grundlage der Chromosomenbanden Gültigkeit zu besitzen:

- 1) der inerte Charakter der hier beschriebenen Färbemethode spricht gegen eine Veränderung der fixierten Chromosomenstruktur;
- 2) die klare Abhängigkeit gut differenzierter Bandendarstellungen von einer exakten Feineinstellung der Farbstoffkonzentration läßt vermuten, daß in den konventionellen Präparaten diese chromosomalen Substrukturen durch Überfärbung unkenntlich wurden; ab einer bestimmten Schwellenkonzentration nehmen offensichtlich auch die "euchromatischen" Bezirke so viel Farbe an, daß Unterschiede nicht mehr wahrnehmbar sind;
- 3) in der noch jungen Geschichte der Chromosomenmorphologie sind für die Bandenmuster sowohl die DNS allein als auch die Proteine allein verantwortlich gemacht worden. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß das Chromatin längs der Chromatid-Achse als ein "Gewebe" von DNS-Protein-Komplexen angeordnet ist, die sich in ihrer Primär-, Sekundär- und Tertiär-Struktur sowohl quantitativ als auch qualitativ unterscheiden: quantitativ, indem sie unterschiedlich stark "gepackt" und gefaltet sind, qualitativ, indem sie verschiedene Basenzusammensetzung und Hüllproteine aufweisen.

6. Anwendung der Methode in der Diagnostik

Nachfolgend wird eine Auswahl zytogenetisch interessanter Fälle vorgestellt, die während der Erprobung der hier dargestellten Methode beobachtet und diagnostiziert werden konnten.

6.1. Ein Fall von Translokationsmongolismus

Das C-G-Banden-Ergebnis bestätigte die mittels der konventionellen Chromosomenfärbung gestellte Diagnose einer unbalancierten D-G-Translokation und präziserte den zytogenetischen Befund als $46, XY, -14, +t(14q_{21}q_{21})$ (vgl. Abbildung).

6.2. Ein Fall von Trisomie 13 (Patau-Syndrom)

Das erste Kind zweier gesunder Eltern wurde mit charakteristischen Fehlbildungen geboren, die von vornherein die Verdachtsdiagnose Patau-Syndrom stellen ließen (Mikrophthalmie, deformierte Ohrmuscheln, Hexadaktylie an beiden Händen ulnar, Kryptorchismus). Mittels der C-G-Bandenendarstellung gelang der überzeugende Nachweis der Trisomie 13 (vgl. die Abbildung). Die Eltern zeigten erwartungsgemäß keinen zytogenetischen Befund.

6.3. Ein Fall von erblichem Y-Polymorphismus

Ein dreijähriger Junge kam zur Chromosomenanalyse mit der Überweisungsdiagnose "Sprachentwicklungsrückstand bei geringgradiger Extremitätendysplasie" (einem Befund der Handwurzel, wie er auch in manchen Fällen von Morbus Down auftritt). Im konventionell hergestellten Karyogramm fand sich außer einem auffallend kleinen Y-Chromosom nichts Abnormes. Die C-G-Bandenfärbung ergab das auf der Abbildung wiedergegebene Karyogramm. Das Y-Chromosom war in der eu- und der heterochromatischen Portion verkleinert.

Die Kontrolluntersuchung der väterlichen Chromosomen ergab ein ganz sprechendes Bild (vgl. Abb.). Unseres Erachtens rechtfertigte dieser

fund die Diagnose einer nicht pathogenen Normvariante des Y-Chromosoms.

6.4. Ein Fall von Polymorphismus auf 13p bei koinzidenteller Dysplasie einer Trägerin der Variante

Es handelt sich um das dritte Kind einer Mutter, die bis auf lithogene Gallenkoliken während der Schwangerschaft, die in Mens VI zur Cholezystektomie veranlaßten, gesund ist. Neben zwei gesunden Söhnen finden sich anamnestisch drei Fehlgeburten (M.II, M.II, M.III). Die Geburt der Patientin verlief komplikationslos. Das Neugeborene zeigte multiple Fehlbildungen: Brachycephalie, tiefsitzende Ohrmuscheln, antomogoloide Augenstellung, kurzen Hals, fischmaulartigen Mund. Von Anfang an war Sondenernährung nötig; das Kind entwickelte sich hochgradig retardiert, bildete erhebliche Extremitätenspastik aus mit Spitzfußstellung, Klinodaktylie bei Arachnodaktylie, dazu ein Strabismus convergens. Darüber hinaus besteht außerordentliche Infektanfälligkeit auf der Basis eines Antikörpermangelsyndroms.

Die multiplen Fehlbildungen veranlaßten schon beim Säugling die Durchführung einer Chromosomenanalyse, die damals nach der konventionellen Methode eine scheinbare Monosomie D bei Trisomie C ergab. Es lag nahe eine unbalancierte Translokation auf das scheinbar fehlende D-Chromosom zu vermuten. Als die gesunden Eltern und Geschwister zytogenetisch untersucht wurden, stellte sich jedoch der identische Befund beim Vater und einem Bruder heraus, während die Mutter und der zweite Bruder ein unauffälliges Karyogramm zeigten.

Bei der nunmehr mit der C-G-Bandenfärbung durchgeführten Nachuntersuchung der Familie zeigte sich die in der Abbildung wiedergegebene Situation: ohne Schwierigkeit läßt sich das scheinbar monosom vorliegende D-Chromosom als Nr. 13 identifizieren, dessen Partner auf Grund der Verlängerung des kurzen Armes bei der Auswertung der konventionell gefärbten Präparate der C-Gruppe zugeordnet worden war. Es erhob sich die Frage, ob hier tatsächlich zusätzliches genetisches Material addiert

worden sei. Da auch der differentielle Bandenbefund sowohl für die Patientin wie für den phänotypisch völlig normalen Vater und Bruder zutrifft, erscheint diese Möglichkeit höchst unwahrscheinlich. Vielmehr ist anzunehmen, daß in diesem Falle eine Verlängerung der kurzen Arme des D 13 vorliegt, also eine Normvariante, wie sie in ganz ähnlicher Weise von Lillian Hsu et al. (1973) einmal für die D- und zweimal für die G-Gruppe beobachtet und beschrieben worden ist. Gigliani et al. (1972) beschrieben ein höchstwahrscheinlich ganz entsprechendes Syndrom, als sie von erblichen Verdoppelungen der Satelliten beim Nr. 14 berichteten, die keine phänotypischen Besonderheiten mit sich brachten.

In unserem Fall lautet die zytogenetische Formel gemäß der Pariser Nomenklatur $46 XX 13ph+$ bzw. $46 XY 13ph+$.

Damit bleibt allerdings die Frage nach der Genese der erheblichen Störungen des kranken Kindes offen. Hier ist als einziger zusätzlicher anamnestischer Hinweis noch die mögliche Strahlenbelastung während der Schwangerschaft (Gallendiagnostik) in Erwägung zu ziehen.

Hier führte die differentielle Färbung nach der C-G-Technik zu einer spezifischen Diagnose und ermöglichte eine positive genetische Beratung der betroffenen Familie.

6. 5. Ein Fall von pränatal diagnostiziertem Klinefelter Syndrom

Der konventionelle Chromosomenbefund aus Fruchtwasserzellen einer 46-jährigen V-Gravida (Amniozentese in der 16. Schwangerschaftswoche) ergab 47 Chromosomen bei 16 der Gruppe C und fünf der Gruppe G. Differentialdiagnostisch bestanden demnach die zwei Möglichkeiten:

- a) weibliches Kind mit Down-Syndrom
- b) männliches Kind mit Klinefelter

Die C-G-Bandenfärbung ergab dann den Karyotyp 47, XXY, bestätigt durch die Bestimmung des Geschlechtschromatin (Barr) sowie die Y-Fluoreszenz in Amnioninterphasekernen. In der 19. Woche wurde die Schwangerschaft unterbrochen. Der Foetus war männlichen Ge-

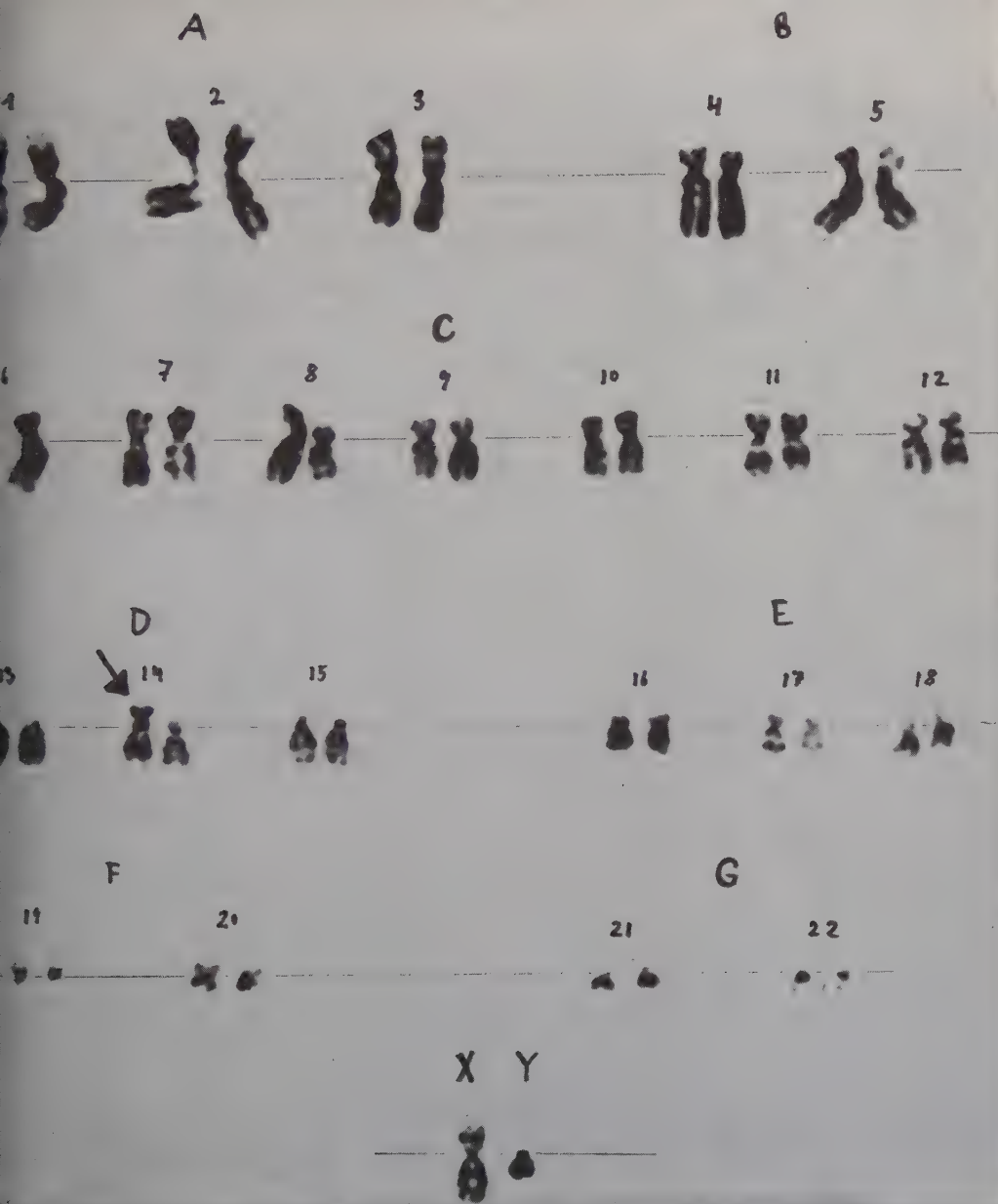


Abbildung zu Fall Nr. 1: Karyotyp: 46,XY,-14,+t(14q 21q)

schlechts; eine nochmalige Chromosomenanalyse aus post mortem aus der Herzhöhle aspiriertem Blut bestätigte erneut den pränatalen Befund, desgleichen das Ergebnis von postmortal angelegten Fibroblastenkulturen. (Murken et al., 1974). Zur pränatalen Diagnostik bei fraglichen chromosalen Verteilungsstörungen leistet die beschriebene Technik also ebenfalls gute Dienste, die Gewebeprovenienz des Untersuchungsmaterials scheint keine entscheidende Rolle für die Banden zu spielen, vorausgesetzt, die Metaphasenqualität entspricht den unter 4.7. genannten Anforderungen.



Abbildung zu Fall Nr. 2: Karyotyp: 47, X Y, +13 (Patau-Syndrom)

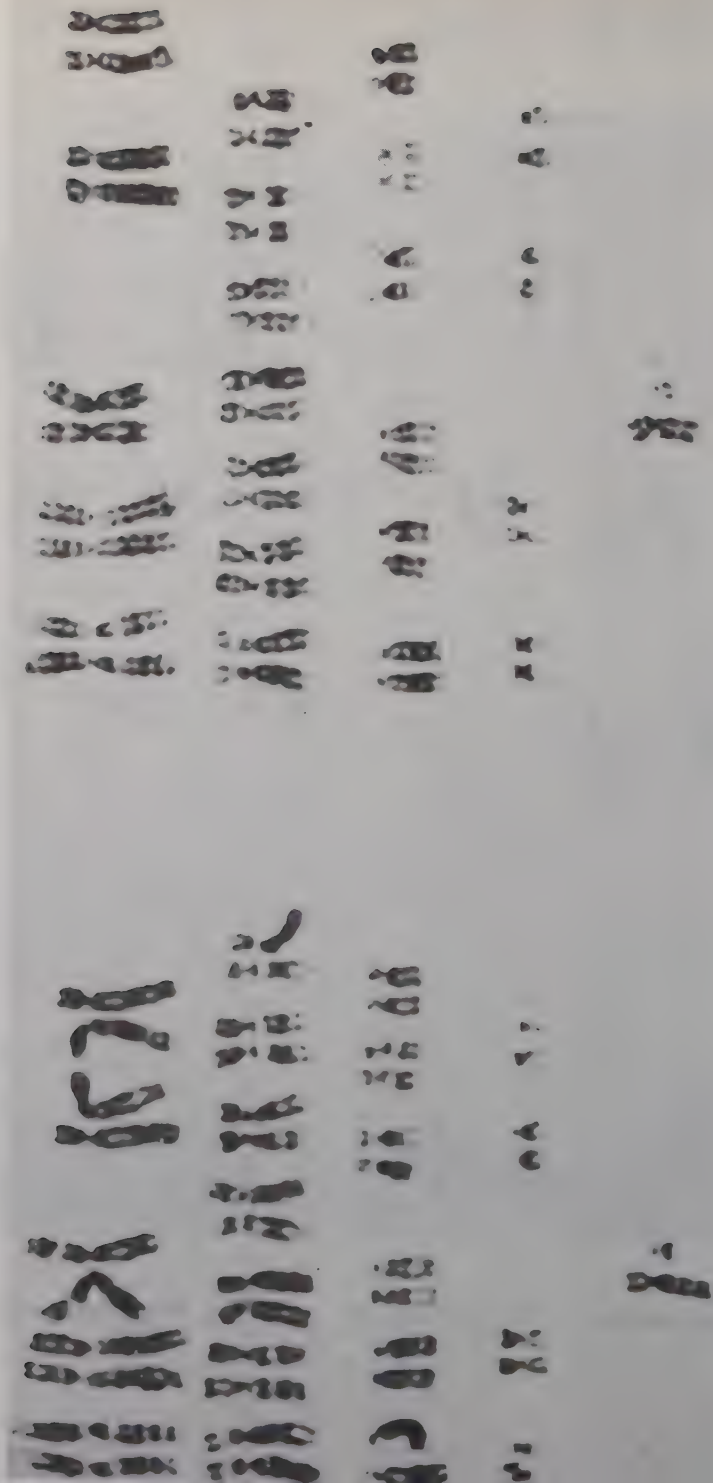


Abbildung zu Fall Nr. 3: Vater und Sohn zeigen den identischen Karyotyp: 46, X Y-q2, 2

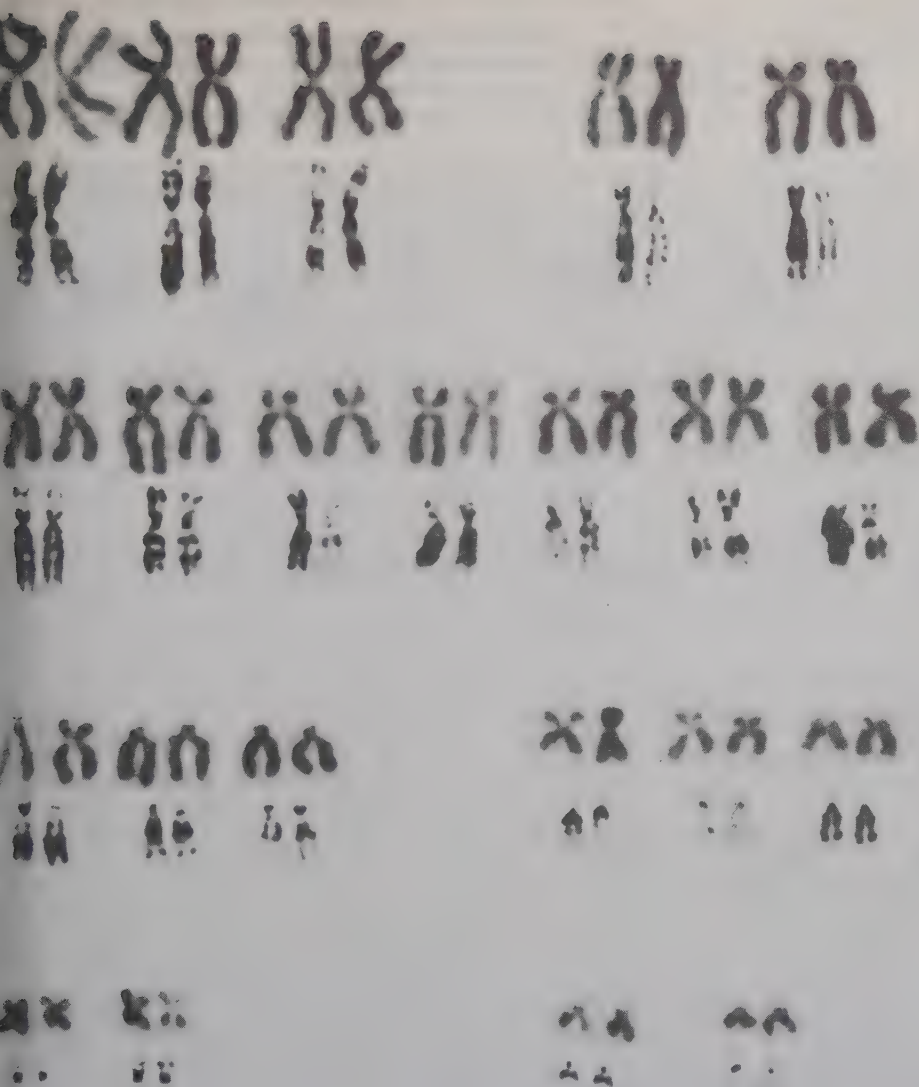
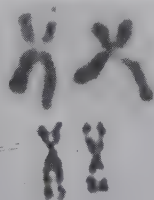


Abbildung zu Fall Nr. 4: Karyogramm nach konventioneller (obere Zeile) und G-C-Banden-Färbung (untere Zeile)

Der in der oberen Zeile pathologisch verlängert erscheinende kurze Arm des einen Chromosoms Nr. 13 (väterlich!) ist auf der Photographie des Bandenpräparates fast überhaupt nicht zu sehen; es ist also anzunehmen, daß er euchroma-



tische Struktur besitzt. Beim Betrachten des mikroskopischen Bildes fällt die Verlängerung des kurzen Armes allerdings deutlicher ins Auge. Schwierigkeiten bei der Identifizierung des fraglich aberranten Chromosoms gab es aber im Gegensatz zur konventionellen Färbung nicht.

Karyotyp: 47, XXY (Bestätigung der pränatalen Diagnose)

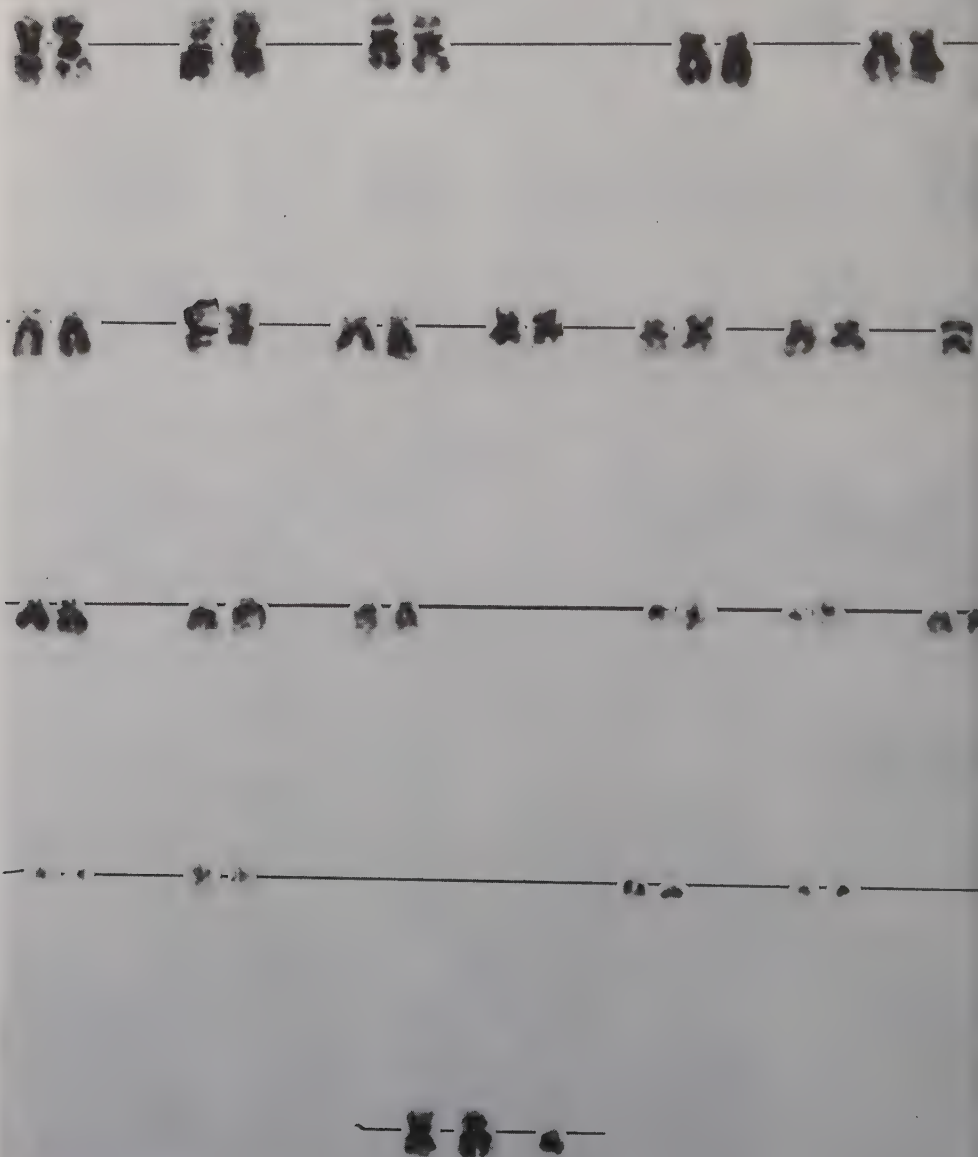
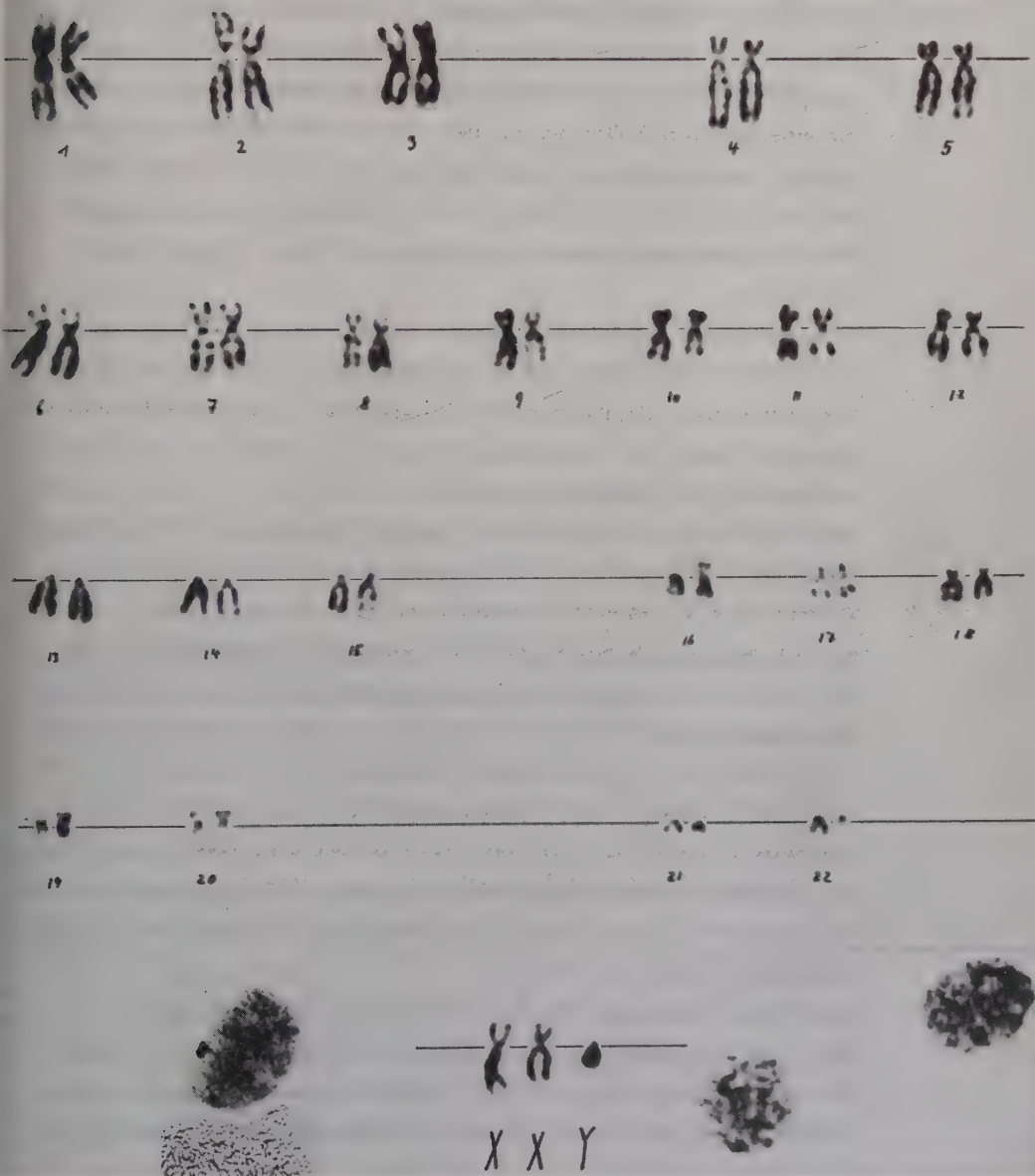


Abbildung zu Fall Nr. 5: Karyogramm der aus dem Fruchtwasserpunktat (M.IV) gewonnenen kindlichen Zellen; Karyotyp: 47,XXY (Klinefelter-Syndrom)



Barr-Körperchen-Färbepreparat aus Fruchtwassersediment: positiv

7.

Zusammenfassung

Die seit Beginn der exakten zytogenetischen Diagnostik im Jahre 1956 hergestellten menschlichen Karyogramme erlaubten eine Differenzierung der Einzelchromosomen lediglich nach relativer Größe und Zentromerindex. Seit 1971 werden Präparations- und Färbetechniken verwendet, die eine spezifische Darstellung der individuellen Chromosomen ermöglichen. Heterogenität und mangelnde Reproduzierbarkeit dieser Methoden führen allerdings zu Unklarheiten und Meinungsverschiedenheiten über den chemisch-strukturellen Hintergrund dieser differentiellen Färbungen.

In der vorliegenden Arbeit wird über die diesbezüglichen experimentellen und theoretischen Entwicklungen anhand der Literatur berichtet. Eine aus eigenen Erfahrungen mit den veröffentlichten Methoden entworfene Modifikation der enzymatischen Technik von Sperling (1972) wird vorgestellt: die Chromosomenpräparate werden nach der Fixierung ohne jede weitere Vorbehandlung sofort gefärbt (Farblösung: 25% Leishman-Methylenblau (Merck) bzw. 1% Giemsa (Merck) in Sörensen-Puffer bei einem pH von 6,8 in einer Konzentration von 1/15 Mol/Liter).

Es fällt auf, daß die bei Sperling als wesentlich angegebene Aktivität des Trypsin hier wegfällt, ohne daß die Bandenfärbung dadurch beeinträchtigt würde. Die Praktikabilität der vorgestellten Methode ist zufriedenstellend, ihre Zuverlässigkeit außerordentlich groß. Es ergibt sich, daß in herkömmlichen Chromosomenfärbungen die individuelle Bandenstruktur wahrscheinlich durch Überfärbung unkenntlich gemacht wird und es daher nur der sorgfältigen Anpassung der Farbstoffkonzentration bei genau eingestellter Molarität der Pufferlösung bedarf, um die prä-existenten Muster darzustellen.

Dies ist von Bedeutung für die Chromatin-Theorie, daß nämlich die Chromosomenbanden nicht erst durch die Färbung entstehen, sondern als morphologische Untereinheiten des Chromosoms - charakterisiert unter anderem durch unterschiedliche Chromatin-Dichte - aufzufassen

sind. Anhand von fünf diagnostischen Fällen aus dem genetischen Labor der Universitäts-Kinderpoliklinik München wird die Leistungsfähigkeit der Methode demonstriert, unter anderen auch an dem zytogenetischen Ergebnis eines Fruchtwasserpunktates, ein Hinweis auf ihre Anwendbarkeit bei den in steigendem Maße zu bewältigenden Aufgaben der pränatalen Diagnostik im Rahmen der präventiven Medizin.

Literaturverzeichnis

- Arakaki, D. T., R. S. Sparkes: Microtechnique for Culturing Leucocytes from Whole Blood. *Cytogenetics* 2, 57 (1963)
- Arrighi, F. E., T. C. Hsu: Localization of Heterochromatin in Human Chromosomes. *Cytogenetics* 10, 81-86 (1971)
- Bhasin, M. K., W. Foerster: A Simple Banding Technique for Identification of Human Metaphase Chromosomes. *Humangenetik* 14, 247-250 (1972)
- Bobrow, M., K. Madan, P. L. Pearson: Staining of Some Specific Regions of Human Chromosomes, particularly the Secondary Constriction of N⁰ 9. *Nature New Biology* 238/82, 122-124 (1972)
- Caspersson, T., S. Farber, G. E. Foley, J. Kudynowski, E. J. Modest, E. Simonsson, U. Wagh, L. Zech: Chemical Differentiation along Metaphase Chromosomes. *Experimental Cell Research* 4, 219-222 (1967)
- Caspersson, T., L. Zech, C. Johansson, E. J. Modest: Identification of Human Chromosomes by DNA-binding Fluorescent Agents. *Chromosoma (Berl.)* 30, 215-227 (1970)
- Chapelle, A. de la, J. Schröder, R. K. Selander, K. Steustrand: Differences in DNA Composition along Mammalian Metaphase Chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* 42, 365-382 (1973)
- Chicago Conference 1966: Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, vol. II, No. 2, New York: The National Foundation (1966)
- Craig-Holmes, A. P., M. W. Shaw: Polymorphism of Human Constitutive Heterochromatin. *Science* 174, 702-704 (1971)
- Denver Report 1960: A Proposed Standard System of Nomenclature of Human Mitotic Chromosomes. *Lancet I*, 1063-1065 (1960)
- Dev, V. G., D. Warburton, O. J. Miller, D. A. Miller, B. F. Erlanger, S. M. Beiser: Consistent Pattern of Binding of Anti-Adenosine Antibodies to Human Metaphase Chromosomes. *Expt. Cell Res.* 74, 288-293 (1972)
- Drets, M. E., M. W. Shaw: Specific Banding Patterns of Human Chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68, 2073-2077 (1971)

- Dutrillaux, B. : Nouveau Système de Marquage Chromosomique des Bandes T. *Chromosoma (Berl.)* 41, 395-402 (1973)
- Dutrillaux, B., J. de Grouchy, C. Finaz, J. Lejeune: Mise en Evidence de la Structure Fine des Chromosomes Humains par Digestion Enzymatique (Pronase en particulier). *Compt. Re. Acad. Sci. Paris, t.* 273, 587-588 (1971)
- Ford, C. E., J. L. Hamerton: The Chromosomes of Man. *Nature* 178, 1020-1023 (1956)
- Gagné, R., C. Laberge: Specific Cytological Recognition of the Heterochromatic Segment of No. 9 Chromosome in Man. *Exptl Cell Res* 73, 239-242 (1972)
- German, J. L. DNA Synthesis in Human Chromosomes. *Transact. N. Y. Acad. Sci.* 24, 295-407 (1962)
- Gigliani, F., A. de Capoa, A. Rocchi : A Marker Chromosome No. 14 with Double Satellite Observed in Two Generations: an Unbalanced Chromosome Constitution Associated with Normal Phenotype. *Humangenetik* 15, 191 (1972)
- Gilbert, C. W., S. Muldal, L. G. Lajtha, J. Rowley: Time Sequence of Human Chromosome Duplication. *Nature* 195, 869-873 (1962)
- Hsu, L. Y. F., E. C. Dubin, T. Kerenyi, K. Hirschhorn: Results and Pitfalls in Prenatal Cytogenetic Diagnosis. *Journal of Medical Genetics* 10, No. 2, 112-119 (1973)
- Hsu, T. C. : Longitudinal Differentiation of Chromosomes. *Ann. Rev. of Gen.* 7, 153-176 (1974)
- Hsu, T. C., S. Pathak, D. A. Shafer: Induction of Chromosome Crossbanding by Treating Cells with Chemical Agents Before Fixation. *Exptl Cell Res.* 79, 484-487 (1973)
- Hsu, T. C., C. M. Pomerat: Mammalian Chromosomes in Vitro. 2. A Method for Spreading the Chromosomes of Cells in Tissue Culture. *Journal of Heredity* 44, 23-29 (1953)
- Kato, H., K. Moriwaki: Factors Involved in the Production of Banded Structures in Mammalian Chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* 38, 105-120 (1972)
- Kim, A., L. Bier, F. Majewski, R. A. Pfeiffer: Fluorochromierung menschlicher Chromosomen mit Atebrin-Essigsäure. *Humangenetik* 12, 257-260 (1971)

- Lundsteen, C., L. Kristoffersen, F. Ottosen :
Studies on the Mechanism of Chromosome Banding with Trypsin. *Humangenetik* 24/1, 67-69 (1974)
- McKay, M. R. C. :
The Mechanisms of G and C Banding in Mammalian Metaphase Chromosomes. *Chromosoma (Berl.)* 44, 1-14 (1973)
- Meisner, L. F., T. W. Chuprevich, S. L. Inhorn :
Giemsa Banding Specificity. *Nature New Biology* 245, 145-147 (1973)
- Miller, O. J., R. R. Schreck, S. M. Beiser, B. F. Erlanger :
Immunofluorescent Studies of Chromosome Banding with Antinucleoside Antibodies. Nobel Symposium 23, Chromosome Identification (1972)
- Moorhead, P. S., P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battips, D. A. Hungerford :
Chromosome Preparation of Leucocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Exptl Cell Res.* 20, 613-616 (1960)
- Morishima, A., M. M. Grumbach, J. H. Taylor :
Asynchronous Duplication of Human Chromosomes and the Origin of Sex Chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci. Washington* 48, 756-763 (1962)
- Murken, J. D., S. Stengel-Rutkowski, J. -U. Walther, S. R. Westenfelder, K. H. Remberger, F. Zimmer :
Klinefelter's Syndrome in a Fetus. *The Lancet* July 20, 171 (1974)
- Murken, J. D., H. von Wilmowsky :
Die Chromosomen des Menschen. Werner Fritsch Verlag München (1973)
- Pardue, M. L., J. G. Gall :
Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA. *Science* 168, 1356-1358 (1970)
- Paris Conference 1971 :
Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, vol. VIII, No. 7, New York: The National Foundation (1972)
- Patil, S. R., S. Merrick, H. A. Lubs :
Identification of Each Human Chromosome with a Modified Giemsa Stain. *Science* 173, 821-822 (1971)
- Pearson, P. L., M. Bobrow, C. G. Vosa :
Technique for Identifying Y Chromosomes in Human Interphase Nuclei. *Nature (Lond.)* 226, 78-80 (1970)
- Röhme, D. :
Prematurely Condensed Chromosomes of the Indian Muntjac: a Model System for the Analysis of Chromosome Condensation and Banding. *Hereditas* 76, 251-258 (1974)

- Schnedl, W. : Banding Pattern of Human Chromosomes. *Nature New Biology* 233, 93-94 (1971)
- Schmid, W. : DNA Replication Patterns of Human Chromosomes. *Cytogenetics* 2, 175-193 (1963)
- Schultz, J., P. St. Lawrence: A Cytological Basis for a Map of the Nucleolar Chromosome in Man. *Journal of Heredity* 40, 31-38 (1949)
- Seabright, M. : A Rapid Banding Technique for Human Chromosomes. *Lancet* October 30, 971-971 (1971)
- Sehested, J. C. : Giemsa Banding in Metaphase Chromosomes after Pretreatment with Inactivated Trypsin. *Humangenetik* 19, 321-325 (1973)
- Shiraishi, Y. : The Differential Reactivity of Human Peripheral Leucocyte Chromosomes Induced by Low Temperature. *Jap. Journal of Genetics* 45, 429-442 (1970)
- Shiraishi, Y., T. H. Yosida: Differential Staining of Human Chromosomes by Treatment with Urea. *Proc. Jap. Acad.* 47, 729-732 (1971)
- Shiraishi, Y., T. H. Yosida: Banding Pattern Analysis of Human Chromosomes by Use of a Urea Treatment Technique. *Chromosoma (Berl.)* 37, 75-83 (1972)
- Sperling, K. : A Rapid Banding Technique for Routine Use in Human and Comparative Cytogenetics. *Humangenetik* 15, 349-353 (1972)
- Sumner, A. T., H. J. Evans, R. A. Buckland : New Technique for Distinguishing Between Human Chromosomes. *Nature New Biology* 232 31-32 (1971)
- Tjio, J. H., A. Levan : The Chromosome Number of Man. *Hereditas* 42, 1-6 (1956)
- Walther, J. -U., S. Stengel-Rutkowski, J. D. Murken : Observations with G Banding of Human Chromosomes. *Humangenetik* 25, 49-51 (1974)
- Wang, H. C., S. Fedoroff: Banding in Human Chromosomes Treated with Trypsin. *Nature New Biology* 235, 52-54 (1972)
- Warburton, D., V. G. Dev, O. J. Miller : Mechanisms of Chromosome Banding. *Am. J. of Human Genetics* 24 9a (Abstracts) (1972)
- Yerganian, G. : Cytologic Maps of Some Isolated Human Pachytene Chromosomes. *American Journal of Human Genetics* 9, 42-54 (1957)

- Yunis, J. J., L. Roldan,
W. G. Yasmineh, J. C. Lee:
Staining of Satellite DNA in Metaphase
Chromosomes. *Nature (Lond.)* 231,
532-533 (1971)
- Yunis, J. J., O. Sanchez:
G Banding and Chromosome Structure.
Chromosoma (Berl.) 44, 15-23 (1973)
- Zakharov, A. F., L. I. Baranovs-
kaya, A. I. Ibraimov, V. A. Ben-
jusch, V. S. Demintseva,
N. G. Oblapenko :
Differential Spiralization along Mamma-
lian Mitotic Chromosomes II. 5-Bromdeoxi-
uridine and 5-Bromodeoxycytidine Revealed
Differentiation in Human Chromosomes.
Chromosoma (Berl.) 44, 343-359 (1974)
- Zakharov, A. F., N. A. Egolina:
Differential Spiralization Along Mitotic
Chromosomes I. BUdR-Revealed Differen-
tiation in Chinese Hamster Chromosomes.
Chromosoma (Berl.) 38, 341-365 (1972)

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn Privat-Dozent Dr. Jan-Dieter Murken, Leitender Oberarzt an der Kinderpoliklinik der Universität München, für die Überlassung des Themas und Bereitstellung großzügigster Arbeitsmöglichkeiten im genetischen Labor.

Herrn Prof. Dr. H. Spiess danke ich für die Übernahme des Ko-referates sowie sein meiner Arbeit zuteil gewordenen Wohlwollen.

In besonderem Maße hat sich Frau Dr. Sabine Stengel-Rutkowski um die Durchsicht meiner Arbeit verdient gemacht.

Für die Einarbeitung in die Technik der Chromosomenpräparation bin ich Fräulein Renate Frankenberger zu großem Dank verpflichtet.

Die Durchführung der Arbeit wurde durch Mittel aus der Dietrich-Vogt-Stiftung (begründet von Heinrich Westphal) ermöglicht, wie auch meine Teilnahme an drei zytogenetischen Symposien:

- 1) DFG-Seminar über klinische Genetik 1972
Leinsweiler Hof
- 2) IV. Tagung der Sektion Zytogenetik der Gesellschaft für Anthropologie und Humangenetik, Berlin, 1974
- 3) International Chromosome Conference, Leyden, 1974

Im Jahre 1974 erhielt ich von der Studienstiftung des deutschen Volkes ein Promotionsstipendium.

Lebenslauf

Am 17. Juli 1948 wurde ich als zweites von drei Kindern des Arztes Dr. med. Rudolf-Joachim Walther und seiner Ehefrau Ingeborg, geborene Buckow, in München geboren.

Nach vier Jahren Grundschulbesuch und neun Jahren am humanistischen Maximiliansgymnasium in München legte ich im Juni 1967 dort die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1967/68 begann ich das vorklinische Studium der Medizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität in München als Stipendiat nach dem Bayer.BFG, seit dem Sommersemester 1968 auch als Mitglied der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Nach im April 1970 bestandenen Physikum setzte ich mein Studium mittels eines Auslandsstipendiums der Studienstiftung in Leeds/England fort, wo ich das erste klinische Jahr absolvierte.

1971 nach München zurückgekehrt, begann ich die Arbeiten zu meiner Dissertation im genetischen Labor der Universitäts-Kinderpoliklinik.

Im Dezember 1973 schloß ich das medizinische Staatsexamen ab.

Vom Februar bis Juni 1974 arbeitete ich als Medizinal-Assistent in der Universitäts-Kinderpoliklinik, von Juni bis Oktober 1974 auf der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses München-Pasing; vom 1. November bis 28. Februar 1975 war ich als Medizinal-Assistent an der Chirurgischen Privatklinik Dr. Schreiber in München tätig.

DRUCK :

Accord Blitz

München 2

Telefon 775218

Lindwurmstraße 60/0 Ghs.



